



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

**EPITOPOS DEL VIRUS DE LA
GASTROENTERITIS PORCINA TRANSMISIBLE
RELEVANTES EN PROTECCION LACTOGENICA**

Tesis presentada por **María Isabel de
Diego de la Torre** para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas por la
Univesidad Complutense de Madrid.



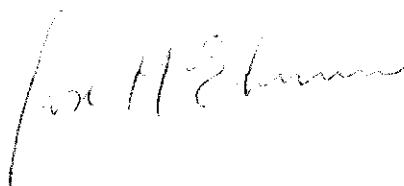
María Isabel de Diego

Madrid, Noviembre de 1993.

R. 21.847

**Esta tesis doctoral se ha realizado en el Dpto. de Sanidad Animal del
Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria,
bajo la dirección del Dr. José Angel Martínez Escribano.**

Vº Bº

A handwritten signature in black ink, appearing to read "José Ángel Martínez Escribano". The signature is written in a cursive style with a large initial "J" and "A".

A mi familia

A Hipólito

AGRADECIMIENTOS

Una vez finalizada esta etapa de mi formación como investigadora he de agradecer mucho a mucha gente :

Al Dr. José Angel Martinez Escribano deseo agradecer, por supuesto, la dirección de este trabajo, pero principalmente el enorme interés mostrado en mi formación científica. A él se la debo.

A Javier Leal y al Dr. José Manuel Sánchez-Vizcaino por haberme dado la oportunidad de ponerme en contacto con la ciencia y permitir que desarrollara mi vocación.

Al Dr. Luis Enjuanes, del Centro Nacional de Biotecnología, por haberme facilitado los anticuerpos monoclonales empleados en esta tesis, así como por su apoyo en la realización del trabajo. Al Dr. Stokes, de la Universidad de Bristol, por haberme facilitado el resto de los anticuerpos monoclonales. Así como al Dr. Santiago Martín Rillo por proporcionar las cerdas gestantes.

Al Dr. Manuel Borca por sus útiles consejos en cromatografía de afinidad sin los cuales este trabajo habría resultado mucho más penoso.

No puedo por menos de agradecer a Lorenzo Ortiz y Vicente Martín el experto, valiente y estoico manejo de los animales, y a Maite Sevilla por su excelente asistencia técnica, sin los cuales esta tesis no habría sido posible.

A Maria Díaz Laviada por enseñarme tantísimo sobre el virus de la gastroenteritis porcina transmisible y proporcionarme todos sus inóculos, sueros, reactivos y transmitirme su "maestría" en su manejo.

A mis todos los miembros del Departamento de Sanidad Animal, en cuyo seno se ha llevado a cabo este trabajo, y especialmente a todos el resto de mis compañeros de laboratorio, Carlos Alcaraz, M^a Jesús Pastor, Fernando Rodriguez, Nuria Gómez, José María Oviedo, Consuelo Carrillo, Miguel Gonzalez, Francisco Sobrino, Ana Rodriguez, Miguel Angel Martinez, Adolfo Eiras, Mar Martín, Amparo Estepa, Marisa Arias, Mercedes Moyano, por eso, por ser mis compañeros de trabajo, con todo lo que ello supone.

No quiero dejar de expresar mi agradecimiento a Hipólito y a mi familia por su incondicional confianza en mi, especialmente en los momentos en que mis ánimos flaqueaban.

Finalmente, no quiero olvidarme de mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que se me hayan podido quedar en el tintero y que, directa o indirectamente, hayan contribuido a que esta tesis sea una realidad.

INDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	i
INTRODUCCION	1
1. GASTROENTERITIS PORCINA TRANSMISIBLE	3
1.1. DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y TRANSMISION	3
1.2. PATOGENIA	5
1.2.1. Síntomas clínicos	7
1.3. ETIOLOGIA	8
1.3.1. Estructura del virión	8
1.3.2. Estructura antigénica de la proteína S	11
1.3.3. Genoma	13
1.3.3.1. Organización y expresión	13
1.3.3.2. Mecanismo de replicación del RNA y ciclo celular	14
2. CORONAVIRUS RESPIRATORIO PORCINO	16
2.1. CARACTERISTICAS DEL CVRP	18
2.1.1. Genoma	18
2.1.2. Proteínas estructurales	21
2.1.3. Estructura antigénica de la proteína S	22
2.2. EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCION POR EL CVRP	23
2.3. PATOGENIA	25

3.	INMUNIDAD FRENTE AL VIRUS DE LA GPT	26
3.1.	INMUNIDAD DE MUCOSAS	26
3.1.1.	Mecanismos no inmunitarios de defensa de mucosas	27
3.1.2.	El sistema inmune de las mucosas	28
3.1.2.1.	Absorción de antígenos y presentación antigénica	29
3.1.2.2.	Activación y migración de linfocitos	31
3.1.2.3.	Regulación de la producción de IgA	33
3.1.2.3.1.	Regulación por linfocitos T	33
3.1.2.3.2.	Regulación por citoquinas	34
3.2.	INMUNIDAD FRENTE AL VGPT	34
3.2.1.	Generación de la respuesta inmunitaria protectora	36
3.2.2.	Vacunación	43
3.2.2.1.	Virus atenuados	44
3.2.2.2.	Cepas variantes	44
3.2.2.3.	Vacunas de subunidades	45
4.	PROTECCION CRUZADA. EL CVRP EN LA PROFILAXIS DE LA GPT	46
	JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	51
	MATERIALES Y METODOS	57
1.	VIRUS	59
2.	LINEAS CELULARES	60

3.	PRODUCCION DE VIRUS EN CULTIVOS CELULARES	60
3.1.	OBTENCION DE INOCULO VIRICO	60
3.2.	SEMIPURIFICACION DE VIRUS	60
3.3.	PURIFICACION DE VIRUS	61
3.4.	TITULACION DE VIRUS	61
3.4.1.	Titulación de inóculo vírico	61
3.4.1.1.	<i>Estimación de la dosis infectiva 50 en cultivo celular (DICC₅₀)</i>	61
3.4.1.2.	<i>Estimación de las unidades formadoras de placa (PFU)</i>	61
3.4.2.	Titulación de virus purificado para ELISA	62
4.	VACUNACIONES Y CONTRAPRUEBAS	62
5.	ANTICUERPOS	63
5.1.	ANTICUERPOS MONOCLONALES	63
5.1.1.	AcMs específicos del VGPT	63
5.1.2.	AcMs específicos de clase de Ig porcina	65
5.1.2.1.	<i>Purificación de AcMs a partir de líquido ascítico</i>	65
5.1.2.2.	<i>Marcaje con biotina de AcMs</i>	66
5.2.	ANTICUERPOS POLICLONALES	66
5.2.1.	Sueros, calostros y leches inmunes	66
5.2.1.1.	<i>Obtención</i>	66
5.2.1.2.	<i>Tratamiento</i>	67
5.2.2.	Sueros de campo anti-CVRP	67
5.2.3.	Clases de Ig purificadas	67

6.	METODOS DE ANALISIS DE PROTEINAS	68
6.1.	MARCAJE METABOLICO DE PROTEINAS CON METIONINA- ³⁵ S	68
6.2.	CONTAJE DE MUESTRAS RADIATIVAS	69
6.3.	METODOS ELECTROFORETICOS	69
6.3.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida-DATD en presencia de SDS (SDS-PAGE)	69
6.3.2.	Fluorografia y autorradiografia	70
7.	VALORACION DE PROTEINAS	70
8.	METODOS SEROLOGICOS	70
8.1.	RADIOINMUNOPRECIPITACION (RIPA) DE PROTEINAS ANTIGENICAS	70
8.2.	DETECCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS MEDIANTE LA TECNICA DE "IMMUNOBLOTTING" (IB)	71
8.3.	ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)	72
8.3.1.	ELISA indirecto para la detección de anticuerpos	72
8.3.2.	ELISA para la determinación de la pureza de las clases de Ig purificadas	72
8.4.	ENSAYOS DE UNION COMPETITIVA AL VGPT	73
8.4.1.	Radioinmunoensayo de competición (RIAc)	73
8.4.2.	ELISA de competición (ELISAc)	74
8.5.	SERONEUTRALIZACION	75
8.5.1.	Determinación del título de SN en DICC ₅₀	75
8.5.2.	Ensayos de reducción del número de placas	75
8.5.3.	Determinación de la cinética de neutralización	76
8.5.4.	Determinación de la reversibilidad de la neutralización	76

9.	ENSAYOS DE PROTECCION <i>IN VIVO</i>	76
	RESULTADOS	79
1.	ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA INMUNITARIA PROTECTORA FRENTE AL VGPT	81
1.1.	RESPUESTA INMUNITARIA CIRCULANTE Y SECRETORA FRENTE AL VGPT Y CVRP EN CERDAS GESTANTES	81
1.1.1.	Vacunación de cerdas gestantes	81
1.1.2.	Título de anticuerpos	82
1.1.3.	Especificidad de la respuesta inmunitaria. Reconocimiento de proteínas	86
1.1.4.	Contraprueba de los lechones	87
1.2.	CARACTERIZACION DE EPITOPOS DEL VGPT Y CVRP INMUNODOMINANTES EN CERDAS INMUNIZADAS	89
1.2.1.	Establecimiento de las condiciones para el RIAC	90
1.2.1.1.	AcMs específicos de la proteína S	90
1.2.1.2.	AcMs específicos de las proteínas M y N	91
1.2.2.	Reconocimiento de epítomos de la proteína S	93
1.2.3.	Reconocimiento de epítomos de las proteínas M y N	97
2.	INDUCCION DE LAS DISTINTAS CLASES DE Ig EN GALT Y EN BALT POR LOS EPITOPOS IMPLICADOS EN LA NEUTRALIZACION DEL VGPT	98
2.1.	PURIFICACION DE CLASES DE Ig	98
2.2.	PUESTA A PUNTO DEL ELISAc	100
2.3.	ESPECIFICIDAD DE LAS CLASES Y SUBCLASES DE Ig INDUCIDAS TRAS PRESENTACION ANTIGENICA EN GALT	101

2.4.	ESPECIFICIDAD DE LAS CLASES Y SUBCLASES DE Ig INDUCIDAS TRAS PRESENTACION ANTIGENICA EN BALT	104
2.5.	COMPARACION DE LA INDUCCION TRAS PRESENTACION ANTIGENICA EN GALT O EN BALT	105
3.	DEFINICION DE LAS CARACTERISTICAS DE LAS Igs RELEVANTES EN PROTECCION <i>IN VIVO</i>	107
3.1.	AFINIDAD	107
3.2.	PROTECCION <i>IN VITRO</i>	108
3.2.1.	Título de neutralización	110
3.2.2.	Cinética de la neutralización	110
3.2.3.	Reversibilidad de la neutralización	112
3.3.	ENSAYOS DE PROTECCION <i>IN VIVO</i>	112
	DISCUSION	115
	CONCLUSIONES	129
	BIBLIOGRAFIA	133

ABREVIATURAS

aa	aminoácido
Ac	anticuerpo
AcM	anticuerpo monoclonal
APC	célula presentadora de antígeno
ATCC	"American Type Culture Collection"
BALT	tejido linfoide asociado al tracto respiratorio
BSA	albúmina sérica bovina
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementario
Ci	Curio
ConA	concanavalina A
CVB	coronavirus bovino
CVC	coronavirus canino
CVRP	coronavirus respiratorio porcino
cpm	cuentas por minuto
CTL	linfocito T citotóxico
DATD	N, N'dialiltartardiamida
DICC₅₀	dosis infectiva 50 en cultivo celular
DMAB	ácido 3-dimetilamino-benzoico
DMEM	medio mínimo esencial de Eagle con la modificación Dulbecco
DNA	ácido desoxiribonucleico
dp	días post-parto
ecp	efecto citopático
ELISA	enzimoinmunoensayo
ELISAc	enzimoinmunoensayo de competición
Fc	fracción constante de las inmunoglobulinas
GALT	tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal
GPT	gastroenteritis porcina transmisible
hpi	horas postinfección
IB	"immunoblotting"
ID	intestino delgado
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IFN	interferón
Ig	inmunoglobulina
IgA-S	IgA secretora
IL	interleuquina
IM	intramuscular
IMM	intramamaria
Kb	kilobases
kDa	kilodaltons
LPS	lipopolisacárido
MBTH	3-metil-2-benzo-tiazolinona hidrazona

MEM	medio mínimo esencial de Eagle
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
mi	multiplicidad de infección
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NA	no aplicable
ND	no determinado
NP40	Nonidet P 40
nt	nucleótido
O.D.	densidad óptica
ORF	fase de lectura abierta
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	tampón fosfato salino
PFU	unidades formadoras de placa
PM	peso molecular
PMSF	Parametilfenilsulfonilo
PP	placas de Peyer
RIA	radioinmunoensayo
RIAc	radioinmunoensayo de competición
RIPA	radioimmunoprecipitación
RNA	ácido ribonucleico
SFB	suero fetal bovino
SDS	dodecilsulfato sódico
SN	seroneutralización
SR	solución de rotura
ST	línea celular de testículo de cerdo
Th	linfocitos T cooperadores
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
VBI	virus de la bronquitis infecciosa de las aves
VDEP	virus de la diarrea epidémica porcina
VGPT	virus de la gastroenteritis porcina transmisible
VRM	virus de la hepatitis murina
VPIF	virus de la peritonitis infecciosa felina
2ME	2-mercaptoetanol

INTRODUCCION

1. GASTROENTERITIS PORCINA TRANSMISIBLE

La gastroenteritis porcina transmisible (GPT) es una enfermedad que afecta a cerdos de todas las edades pero que es especialmente grave en lechones lactantes, menores de dos semanas de edad, en los que la tasa de mortalidad puede alcanzar el 100% (Bohl, 1981; Sidell y col., 1983). La GPT es una de las enfermedades más devastadoras de los cerdos recién nacidos debido a la alta mortalidad que genera, la ausencia de un tratamiento eficaz y la limitada efectividad de las vacunas disponibles.

1.1. DISTRIBUCION GEOGRAFICA Y TRANSMISION

El proceso fue descrito clínicamente por primera vez en 1946 por Doyle y Hutchings, en EE.UU., quienes además aislaron el agente causal, demostrando así su etiología vírica. A partir de este momento, se publicó la presencia de GPT también en Japón, Inglaterra y posteriormente en numerosos países europeos, Canadá, América Central y del Sur y en algunos países asiáticos: Taiwan, Corea, Filipinas y China (Sasahara y col., 1958; Goodwin y Jennings, 1958; Saif y Bohl, 1986; Pensaert y col., 1987). En Irlanda, sin embargo, parece que no se introdujo hasta el año 1984, en el que se detectó el primer brote. La GPT se ha convertido en una de las enfermedades que más problemas causa a la porcinocultura intensiva, siendo tanto así que Ferris (1973) y Kliebenstein y col. (1982/1983) colocan a la GPT como la enfermedad vírica del cerdo más importante en EE.UU..

En España se describió por primera vez en 1960, basándose únicamente en observaciones clínicas (Concellón, 1960). La situación epidemiológica de la GPT en España ha sido diferente a la de otros países europeos, gracias al relativo aislamiento en que se mantuvo la población porcina, hasta la apertura de las fronteras a la importación de cerdos vivos, desde otros países de la C.E.E.. En los 20 años que siguieron a la primera descripción de la enfermedad no se dieron a conocer nuevos datos sobre esta en nuestro país, hasta que en 1982 se volvió a diagnosticar, clínica y laboratorialmente, un brote de GPT en el área mediterránea (Plana y col., 1982). Posteriormente, en 1988, Laviada y col. diagnosticaron un brote de GPT en la provincia de Madrid, mediante el aislamiento y caracterización del virus responsable (cepa MAD-88). En este caso las características clínicas y epidemiológicas fueron las típicas, aunque aparentemente se mantuvo circunscrito a la explotación afectada. Se pudo demostrar que la infección había sido introducida en la explotación por lechones importados de Bélgica. Sin embargo, se desconoce la incidencia real que la enfermedad tiene en nuestro país aunque parece que la difusión de esta es muy limitada ya que Rubio y col., en 1987, no encontraron ningún animal seropositivo entre 530 cerdas de desvieje procedentes de siete provincias de Castilla y León.

Para evaluar la incidencia de la enfermedad en varios países se han llevado a cabo estudios serológicos de la población. Los resultados de dichos estudios indican que las infecciones por este virus son más numerosas que el número de diagnósticos clínicos, probablemente debido a que las infecciones de cerdos adultos pasan desapercibidas y no son diagnosticadas. Así, por ejemplo, se ha encontrado que el porcentaje de cerdos positivos en Francia es del 17% (Toma y col., 1978), en la República Federal de Alemania 21% (Witte, 1974), en Canadá 7,6% (Gagnon y col., 1974), en EE.UU. 31% (Egan y col., 1982).

Actualmente, es muy difícil evaluar la prevalencia y distribución geográfica de la forma entérica del virus de la GPT (VGPT) desde la aparición de una variante de tropismo respiratorio, con una gran similitud antigénica, y que se ha hecho enzoótica en la mayoría de los países europeos.

La GPT es una enfermedad de tipo estacional que se caracteriza por una rápida diseminación de la infección a la mayoría de los animales de todas las edades, especialmente si el brote tiene lugar en invierno, y es el clásico ejemplo de una infección que puede producirse como epizootica, enzoótica o intermitentemente enzoótica.

El virus infecta a los cerdos receptivos habitualmente por vía oral. La infección llega a las granjas o rebaños generalmente vehiculada por cerdos que excretan virus. Puede haber también transmisión indirecta a través de la ropa, el calzado, los vehículos, etcétera, contaminados con heces que contengan virus. Esta transmisión indirecta es más fácil en invierno, ya que el virus mantiene mejor su capacidad infectante en el ambiente a baja temperatura, con humedad alta y con escasa radiación solar (Haelterman, 1962).

1.2. PATOGENIA

La patogenia de la gastroenteritis porcina transmisible ha sido revisada por varios autores (Hooper y Haelterman, 1966; Haelterman, 1972; Moon, 1978; Bachmann, 1979; Shepherd y col., 1979).

La GPT es una infección localizada en el intestino delgado (ID) que se produce generalmente por ingestión, aunque a veces también por inhalación. El virus es ingerido y, dada su resistencia tanto al bajo pH de los jugos gástricos, como a la acción de las enzimas proteolíticas y la bilis, entra en contacto y se adhiere a las células epiteliales de la superficie luminal del ID, principalmente del yeyuno y comienzo del íleon, aunque afecta prácticamente a todo el ID.

Las células blanco son, concretamente, los enterocitos maduros que recubren las vellosidades intestinales, mientras que las células inmaduras de las criptas son resistentes a la infección. Las células afectadas son destruidas o su función es alterada como consecuencia de la infección con el VGPT, que replica en el citoplasma de estas

células. Como resultado de esta replicación, que dura unas 4 ó 5 horas, se produce degeneración celular y descamación que comienza a las 12 horas postinfección (hpi).

La destrucción de los enterocitos hace que se pierda la actividad enzimática de estas células, y se alteren la capacidad de digestión, la absorción y la secreción del ID. La pérdida de los enterocitos provoca un marcado acortamiento en la longitud de las vellosidades intestinales, siendo esta atrofia de las vellosidades la lesión más característica de esta infección.

Por lo que se refiere a la actividad enzimática del ID, la pérdida de las disacaridasas de las microvellosidades hace que los disacáridos, procedentes de la digestión de los hidratos de carbono, no se hidrolicen. Los lechones lactantes hidrolizan la lactosa para obtener la glucosa necesaria para su metabolismo por lo que la pérdida de la lactasa hace que no se hidrolice esta, produciéndose una hipoglucemia grave. Del mismo modo, los aminoácidos (aa) y oligopéptidos, así como los ácidos grasos y monoglicéridos, procedentes de la predigestión por el ácido clorhídrico, las enzimas gástricas y pancreáticas y las sales biliares, pasan a través del ID sin sufrir los procesos normales de digestión.

Todos los nutrientes que quedan sin digerir en el intestino delgado ejercen una fuerza osmótica que retiene agua en la luz intestinal provocando diarrea y deshidratación. En casos graves puede incluso haber salida de fluidos corporales a la luz intestinal, aumentando el grado de deshidratación y la diarrea (Hooper y Haelterman, 1966). Por otra parte, la destrucción celular disminuye la absorción tanto por reducción de la superficie disponible como por la pérdida de capacidad de absorción, ya que los enterocitos destruidos por el virus son reemplazados por la migración de células inmaduras desde la criptas de Lieberkhün, que carecen de dicha capacidad. Se produce así el llamado **síndrome de malabsorción**. Los nutrientes no absorbidos, además, aumentan la fuerza osmótica en la luz intestinal contribuyendo a la retención de fluidos, deshidratación y diarrea. Además hay una alteración del flujo de sodio y acumulación en la luz del ID de agua y electrolitos. Cornelius y col. (1968)

sugieren que la causa última de la muerte es la deshidratación y la acidosis metabólica unida a una función cardíaca anormal debida a la hiperkalemia.

El VGPT tiene mayor tropismo por los enterocitos más maduros y, por tanto, la infección es más extensa en los lechones jóvenes que poseen un menor grado de renovación de los enterocitos que los cerdos adultos. La gravedad de la infección y la mortalidad disminuyen a medida que aumenta la edad de los cerdos ya que, con ella, aumentan tanto la capacidad de regeneración de los enterocitos destruidos como la capacidad de resistir a la deshidratación por aumentar la capacidad de absorción en el colon.

1.2.1. Síntomas clínicos

La GPT presenta un cuadro clínico caracterizado por vómitos, diarrea y deshidratación. La gravedad de estos síntomas clínicos, la duración de la enfermedad y la mortalidad tienden a ser inversamente proporcionales a la edad, no produciéndose, generalmente, muertes en cerdos mayores de tres semanas de edad, a menos de existir complicaciones debidas al estrés o infecciones concurrentes, comunes en el destete.

En los lechones lactantes los síntomas clínicos de la enfermedad incluyen vómitos transitorios, seguidos de una diarrea acuosa amarillenta o verdosa, pérdida de peso y deshidratación. El lechón se va debilitando paulatinamente y la muerte suele sobrevenir entre los 2 y 7 días del inicio de los síntomas. Esta sintomatología clínica puede parecerse a las diarreas producidas por *Escherichia coli*, rotavirus y por el virus de la diarrea epidémica porcina (VDEP).

Los síntomas clínicos en los cerdos adultos se limitan a falta de apetito y diarrea de corta duración, pudiendo darse infecciones subclínicas. Algunas cerdas en período de lactación contraen una enfermedad aguda, mostrando falta de apetito, vómitos, fiebre, diarrea y agalactia, pudiendo desembocar en abortos (Saif y Bohl, 1986). Sin embargo, parece no existir infección fetal.

1.3. ETIOLOGIA

El virus causante de la gastroenteritis porcina transmisible fue aislado por primera vez en 1945 por Doyle y Hutchings y está clasificado dentro de la familia *Coronaviridae* (Spaan y col., 1988). Los viriones son esféricos y de un tamaño aproximado de 100 nm de diámetro. Esta familia se caracteriza porque sus miembros tienen un genoma formado por un RNA monocatenario de polaridad positiva y tres proteínas estructurales mayoritarias (Jiménez y col., 1986; Spaan y col., 1988; Laude y col., 1990). Una de ellas, la proteína N, se halla asociada al RNA formando la nucleocápsida. Las otras dos, S y M, son glicoproteínas y están embebidas en una bicapa lipídica, constituyendo la envoltura. La proteína S forma los peplómeros característicos de los coronavirus, estructuras en forma de maza, que se proyectan hacia el exterior dando el aspecto de una corona, lo que da el nombre a la familia (Fig. 1).

1.3.1. Estructura del virión

La proteína N, de 382 aa, tiene un peso molecular (PM) de 43 kDalton (kDa) y es muy básica. Está fosforilada en los residuos de serina (un 10% del total). La secuencia de aa presenta tres áreas de homología con la secuencia de la proteína N de los coronavirus VHM (virus de la hepatitis murina) y VBI (virus de la bronquitis infecciosa de las aves). Estas tres regiones podrían ser las que interaccionan con el RNA (Kapke y Brian, 1986; Britton y col., 1988). Su función principal es la encapsidación del RNA genómico, facilitando su incorporación a los viriones. También ha sido implicada en los procesos de replicación del RNA (Compton y col., 1987), aunque se desconoce si ejerce una acción directa en la síntesis o si únicamente evita la rápida degradación del RNA formado.

La proteína M, más pequeña: 262 aa, (29,5 kDa de PM), es también básica. Lo más característico de la proteína es que se encuentra parcialmente embebida en la membrana por medio de 3 regiones muy hidrofóbicas con estructura en α -hélice que atraviesan la bicapa lipídica. La región carboxi-terminal es relativamente hidrofílica

y se sitúa hacia el interior del virión. En la parte amino-terminal tiene un péptido señal de 17 aa que no existe en otros coronavirus (Kapke y col., 1987; Laude y col., 1987; Rasschaert y col., 1987a; Britton y col., 1988). Este péptido se separa tras una rotura proteolítica y no está presente en el virión maduro. El extremo amino-terminal de la proteína M del VGPT tiene más aa que otros coronavirus (11, 12 y 16 más que el VHM, CVB (coronavirus bovino) y VBI, respectivamente). Es posible que el péptido señal, aunque no sea imprescindible, ayude en la translocación de esta proteína que tiene más aa hacia el exterior, y se haya seleccionado durante la evolución (Kapke y col., 1988). La proteína M posee 2 sitios para una posible N-glicosilación pero sólo uno de ellos es utilizado, ya que el otro se encuentra en una de las regiones que atraviesan la membrana, y, por tanto, no es funcional.

La función de esta proteína no está clara porque es una proteína diferente a las proteínas de matriz presentes en otros virus con envoltura. Los datos que existen en la bibliografía (Tooze y col., 1984) indican que esta proteína es necesaria para la maduración del virus. La región interna debe interactuar con la nucleocápsida y esta interacción podría ser fundamental para el ensamblaje de las partículas víricas porque este se produce donde se acumula la proteína M. Sin embargo, hasta el momento no se conoce el dominio de la proteína M que interactúa con la nucleocápsida. Por otra parte, parece que juega un papel importante en la neutralización mediada por el complemento (Woods y col., 1986, 1988) y en la inducción de la producción de interferón α (IFN α) (Charley y Laude, 1988).

La proteína S es la de mayor PM de las 3 (200 kDa), con 1447 aa, que incluyen una secuencia señal secretora de 16 aa, ausente en la proteína madura. Posee 32 sitios posibles de N-glicosilación (Asn-X- Ser/Treo) aparentemente funcionales. Cerca de la región C-terminal tiene una secuencia hidrofóbica típica, probablemente responsable del anclaje del peplómero a la envoltura (Rasschaert y col., 1987a; Rasschaert y Laude, 1987; Jacobs y col., 1987). De Groot y col. (1987a) han propuesto un modelo de estructura tridimensional para esta proteína. Según este modelo, la proteína consta de una parte globular hacia el exterior (parte amino-terminal) y otra parte con estructura

en α -hélice cuyo extremo se inserta en la membrana (extremo carboxi-terminal). Delmas y Laude (1990) han demostrado que cada espícula está formada por un homotrímero de proteína S, en el que la región por la que se ancla a la membrana está constituida por las regiones carboxi-terminales de las 3 moléculas enrolladas entre si. (Fig. 1)

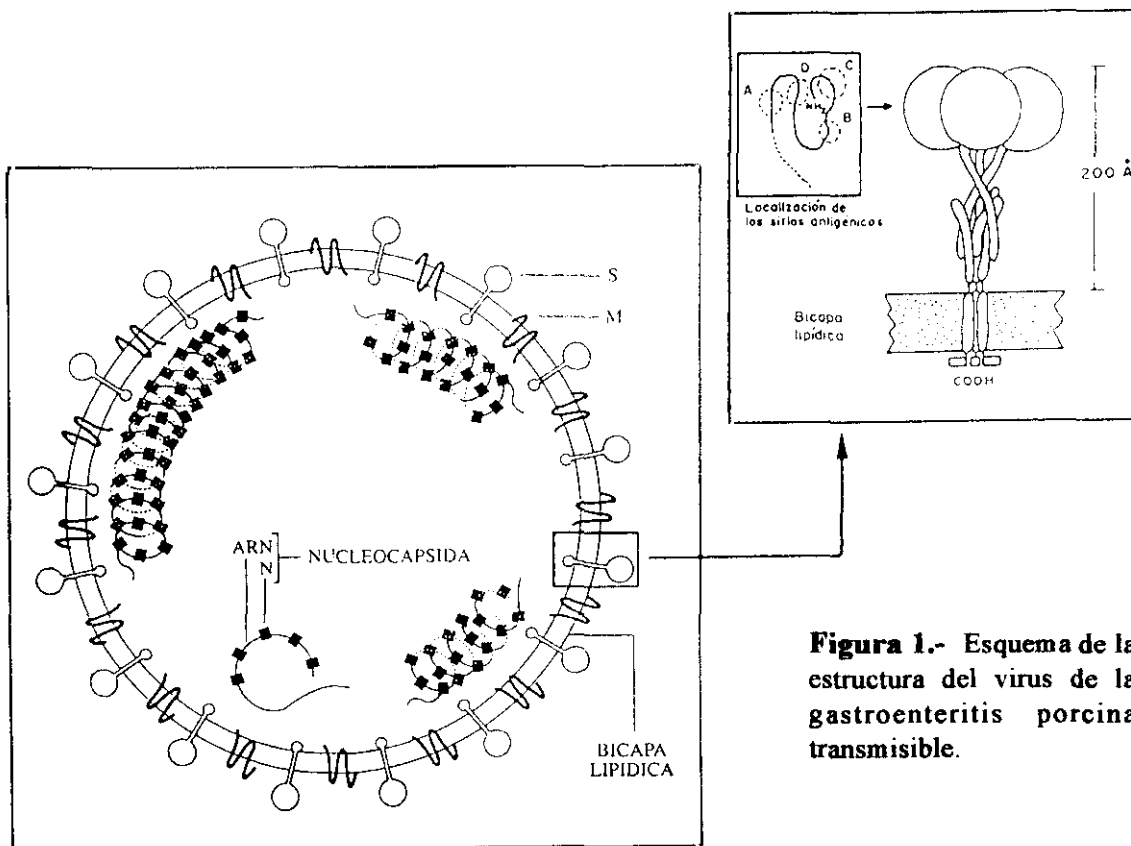


Figura 1.- Esquema de la estructura del virus de la gastroenteritis porcina transmisible.

A diferencia de otros coronavirus, la proteína S del VGPT no sufre una rotura proteolítica en 2 subunidades para ser funcional. Al igual que el virus de la peritonitis infecciosa de los felinos (VPIF) y el coronavirus canino (CVC), carece de la secuencia de residuos básicos por la que se produce la rotura en los otros coronavirus.

La glicoproteína S es la única que se ha implicado en la neutralización del virus en ausencia de complemento (Garwes y col., 1978/1979; Jiménez y col., 1986). Además, es la responsable de la unión del virus a la célula diana; por tanto, es la que

determina el tropismo del virus por un determinado órgano o tipo celular. Recientemente se ha demostrado que el receptor celular para el virus es la aminopeptidasa N (Delmas y col., 1992). Igualmente, la proteína S posee actividad de fusión de membranas, lo que permite a la nucleoproteína vírica penetrar en el citoplasma (Laude y col., 1986).

1.3.2. Estructura antigénica de la proteína S

La proteína S del VGPT es la más importante desde el punto de vista de la protección ya que , como han demostrado varios autores, es en esta proteína donde se encuentra el antígeno crítico dominante para la neutralización del virus (Garwes y col., 1978/1979, 1988; Jiménez y col., 1986).

Su estructura antigénica ha sido estudiada en detalle, utilizando varias colecciones de anticuerpos monoclonales (AcMs) específicos para esta proteína (Delmas y col., 1986, 1990; Jiménez y col., 1986; Correa y col., 1988, 1990; Gebauer y col., 1991). Se han definido cuatro sitios antigénicos (A, B, C y D) mediante competición mutua entre AcMs. Tres de los sitios antigénicos descritos por Correa y col. (1990) solapan con sitios descritos por otros autores (Delmas y col., 1990). Los sitios A y D, y en menor extensión el sitio B, están implicados en la neutralización del VGPT (Delmas y col., 1986; Jiménez y col., 1986; Correa y col., 1990). Jiménez y col. (1986) mediante el empleo de una colección de 26 AcMs específicos de la proteína S del VGPT, identificaron seis epítomos críticos en la neutralización del virus, que estaban muy conservados entre 11 cepas de VGPT de diferente origen y número de pases.

Correa y col. (1988), mediante radioinmunoensayo competitivo (RIAc) y por selección de cepas víricas mutantes resistentes a la neutralización con AcMs, han determinado la estructura antigénica de la proteína S del VGPT según tres grados de complejidad: sitio antigénico, subsitio antigénico y epítopo. El sitio A es dominante en la neutralización del virus y ha sido dividido en tres subsitios antigénicos (Aa, Ab, Ac) y 8 epítomos. Este sitio es conformacional y está glicosilado. La presencia de las

cadenas glicosídicas es esencial para que se produzca un correcto reconocimiento por parte de los anticuerpos (Acs). El sitio B es también sensible a la desnaturalización y dependiente de la glicosilación. Sin embargo, los sitios C y D son reconocidos en la proteína desnaturalizada con SDS y 2ME, y son independiente y parcialmente dependientes de glicosilación respectivamente.

Así mismo, se ha correlacionado la estructura antigénica con la estructura física de la proteína (Delmas y col., 1990; Correa y col., 1990): los sitios antigénicos inmunodominantes se han localizado en el extremo amino-terminal, en el primer 37% de la cadena polipeptídica, coincidiendo con la porción globular de la molécula, que es la zona más expuesta del peplómero que forma la proteína S (Fig. 1). Según se deduce del análisis antigénico de fragmentos procedentes de la proteólisis de la proteína, así como de productos de expresión de fragmentos del gen insertados en *E. coli*, de la secuenciación del genoma de mutantes resistentes a AcMs, y del empleo de la técnica de PEPSCAN ("Peptide Scanning") el sitio A es complejo y discontinuo, formado por residuos dentro de la secuencia 1-325 y por los residuos 538 y 543. Los sitios B y C estarían también comprendidos dentro de los residuos 1-325 y el sitio D en la zona comprendida entre 379 y 529. Los epítomos correspondientes al sitio C no dependen de la conformación proteica y están menos conservados entre las distintas cepas que los sitios A, B y D. Al ensamblarse la proteína en trímeros para formar el peplómero se reconocen en este dos sitios antigénicos que no aparecen en los monómeros de la proteína S (Delmas y col., 1990).

En cuanto a la presencia de epítomos T se ha demostrado que la respuesta inmune frente al VGPT es dependiente de células T, ya que se puede inhibir la síntesis de anticuerpos *in vitro* deplecionando la población de esplenocitos con marcadores Lyt1 o L2T4. Se ha conseguido, también, obtener hibridomas T cooperadores (Th) específicos para el virus (Bullido y col., 1989).

1.3.3. Genoma

1.3.3.1. Organización y expresión

La organización del genoma de los coronavirus se ha deducido a partir de las relaciones entre las secuencias de los RNA mensajeros (mRNA) y por estudios de traducción *in vitro* con mRNA individuales (Bournsnel y col., 1987; Armstrong, 1983; Skinner y Siddell, 1983, 1985; Skinner y col., 1985; Budzillowicz y Weiss, 1987; Schmidt y col., 1987; Luytjes y col., 1987, 1988; Rasschaert y col., 1987a).

El genoma de los coronavirus es el más grande entre los virus con RNA monocatenario. Está formado por una cadena de RNA, de polaridad positiva, con un tamaño aproximado de 27 a 30 Kb, 24 Kb en el caso del VGPT, con un peso molecular de $6,8 \times 10^6$ (Brian y col., 1980). Está poliadenilado en el extremo 3' y es infeccioso si se transfecta el RNA desnudo en una línea celular susceptible a la infección.

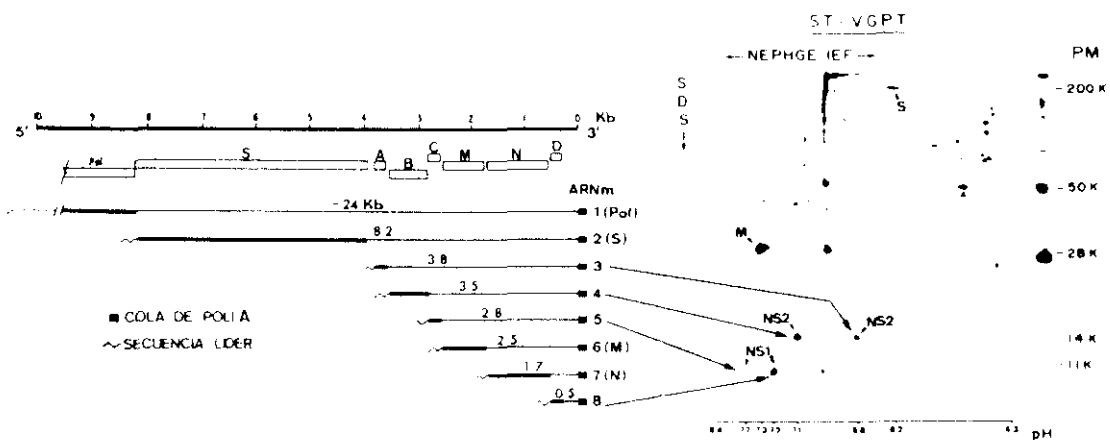


Figura 2.- Esquema de la organización del genoma del VGPT en el que se señala una posible correspondencia entre los genes de proteínas no estructurales y las proteínas que se han identificado en la célula infectada. Los genes se indican con recuadros y con trazo grueso la parte de cada mRNA que se traduce. La parte de la derecha corresponde al análisis por electroforesis bidimensional de un extracto de células infectadas. (Tomado de Laviada y col., 1992).

Está organizado en 8 regiones (Wesley y col., 1989) y cada una tiene una o más fases de lectura abierta (ORF) que están separadas por secuencias de unión que contienen la señal para la transcripción de múltiples mRNA subgenómicos. Se conocen los genes que codifican las tres proteínas estructurales S, M y N. Además se han identificado otras cuatro regiones (A, B, C y D) que pueden codificar proteínas no estructurales. Se ha encontrado en las células infectadas un polipéptido de 14 kDa que corresponde al gen D (Garwes y col., 1989), mientras que otros cuatro polipéptidos no estructurales, que han sido localizados en las células infectadas y cuya función se desconoce por el momento, no se han podido relacionar hasta el momento con su gen correspondiente. No obstante, Laviada y col. (1991) proponen una posible correspondencia entre los genes de proteínas no estructurales y las proteínas que se han identificado en la célula infectada. En la figura 2 se muestra un esquema de la organización del genoma del VGPT en la que se señala dicha posible correspondencia.

Recientemente, se ha propuesto como proteína integral asociada al virión, un polipéptido de 10 kDa, codificado por el mRNA 4, que se ha designado sM (Godet y col., 1992).

1.3.3.2. Mecanismo de replicación del RNA y ciclo celular

El mecanismo de transcripción se ha estudiado con detalle principalmente en los coronavirus VHM y VBI (Lai, 1986, 1990). El virus ha de tener un mecanismo de síntesis particular que neutralice los efectos de los errores que se cometen en la síntesis de su genoma, de un tamaño muy grande, debidos a la alta frecuencia de error que presenta la síntesis de RNA dependiente de RNA.

El virus penetra en la célula a través de un receptor. La proteína S es el componente del virus que interacciona con el receptor celular. Una vez que el genoma vírico es liberado al interior de la célula todo el ciclo de replicación tiene lugar en el citoplasma, sin que intervenga para nada el núcleo celular.

La replicación comienza con la síntesis de una RNA polimerasa codificada por el virus. Esta polimerasa transcribe el RNA genómico en cadenas completas de polaridad negativa, que sirven de molde para la síntesis de los mRNA. En VBI, VHM y VGPT existe una secuencia conservada de 10 nucleótidos (nts) a 80 bases del extremo 3' del RNA genómico (Kapke y Brian, 1986), que podría ser crítico para la síntesis del RNA de polaridad negativa. A partir de estas cadenas de polaridad negativa se sintetiza un conjunto de 8 mRNA (Wesley y col., 1989) de tamaños decrecientes que tienen en común el extremo 3', es decir, todos, menos el más pequeño, son policistrónicos. Sin embargo, funcionalmente se comportan como monocistrónicos ya que de cada uno de ellos se traduce únicamente la secuencia no común con el mRNA inmediatamente menor. Algunos autores han encontrado un número diferente de mRNA, que varía entre 5 y 9 (Hu y col., 1984; Jacobs y col., 1986; Dennis y Brian, 1982).

Todos los mRNA así como el RNA genómico contienen una secuencia idéntica de unos 70 nts en el extremo 5', llamada **secuencia líder**. Esta secuencia no se encuentra en regiones internas del genoma, aunque en la región intergénica que precede a cada gen se encuentra una pequeña secuencia, de 8 a 10 nts, homóloga al extremo 3' de la secuencia líder, llamada **secuencia consenso**. La secuencia líder de cada mRNA procede del extremo 5' del genoma. El modelo más aceptado para explicar la transcripción independiente de cada mRNA de forma que contenga la secuencia líder unida al resto de una secuencia que se inicia en un punto que está bastante distante del extremo 5', es el siguiente: en primer lugar se transcribe la secuencia líder del extremo de la cadena molde negativa. Se disocia del molde, probablemente porque encuentra una estructura secundaria (Baric y col., 1987) que impide la actuación de la polimerasa, y se vuelve a asociar por una zona intergénica en la que reconoce la secuencia consenso, sirviendo así de iniciador para la transcripción. Este modelo de transcripción discontinua es único, y explica la alta frecuencia de recombinación que presentan los coronavirus.

Los mRNA se emplean para la síntesis de las proteínas estructurales y no estructurales. La acumulación de las proteínas estructurales es un requisito para que se

produzca el ensamblaje de las partículas víricas, y puede ser también la señal para que dejen de sintetizarse los mRNA y comience la síntesis de RNA genómico.

El ensamblaje de las partículas víricas probablemente se inicia por la interacción entre el RNA genómico y la proteína N, formándose la nucleocápsida. A continuación la proteína M se unirá a esta. La gemación tiene lugar en las membranas del retículo endoplasmático y aquí adquiere la bicapa lipídica y la proteína S. Las partículas víricas maduras son transportadas por el aparato de Golgi y se liberan de la célula.

La glicoproteína S en exceso es transportada a la membrana plasmática de la célula infectada. Se ha demostrado que también la proteína M del VGPT está presente en la membrana externa de la célula (Laviada y col., 1990), lo que la diferencia de la proteína M del VHM o del coronavirus bovino (CVB).

2.- CORONAVIRUS RESPIRATORIO PORCINO

En 1986 se describió una variante del VGPT, aparecida espontáneamente, de tropismo respiratorio, antigénicamente muy similar a este. Pensaert y col. (1986) detectaron en Bélgica, en 1984, un aumento del triple en la prevalencia de animales seropositivos al VGPT, con respecto a la media observada en los 16 años anteriores, sin que esto supusiera un aumento en el número de brotes clínicos de GPT. Estos datos hicieron sospechar la posible aparición de un virus que, siendo antigénicamente común con el VGPT, produjese una infección subclínica en los cerdos. Así mismo, la dispersión geográfica de los animales seropositivos permitía suponer que dicho agente se transmitía por vía aerógena.

Los estudios concluyeron con el aislamiento de un virus (Pensaert y col., 1986, 1987) que era indiferenciable de las cepas conocidas del VGPT y que fue considerado una cepa mutante del VGPT, denominándose TLM-83 ("TGE-like mutant-83"). Actualmente recibe el nombre de Coronavirus Respiratorio Porcino (CVRP) ya que en

la infección natural este virus se multiplica en el aparato respiratorio del cerdo, especialmente en las células epiteliales de alvéolos y bronquiolos.

La infección por el CVRP no provoca sintomatología entérica, ya que su capacidad de replicación intestinal es muy limitada (Cox y col., 1990a). La capacidad patógena del virus para el aparato respiratorio ha sido un aspecto controvertido. Así, algunos autores afirman que la infección, tanto experimental como natural, no induce ninguna alteración respiratoria (O'Toole y col., 1989; Pensaert y col., 1986; Wesley y col., 1990), a pesar de la presencia de lesiones neumónicas. Según otros, la infección provocaría sintomatología influenzoide (Duret y col., 1988; Vannier y col., 1977) o un estado caracterizado principalmente por fiebre y anorexia (Jestin y col., 1987a; Laval y col., 1991; Ulbrich y col., 1991) e incluso podría llegar a ser letal (Van Nieuwstadt y Pol, 1989).

Tras la primera descripción del CVRP, la infección se ha difundido muy rápidamente y se ha extendido a la mayoría de los países europeos. Pensaert y Cox (1989) afirman que la infección por el CVRP es enzoótica en la mayoría de las explotaciones porcinas belgas. Recientemente se ha identificado también en Estados Unidos (Wesley y col., 1990).

En 1989, Yus y col. en una encuesta realizada sobre cerdos de cebo de la provincia de Segovia, encontraron un 87% de animales seropositivos al VGPT. Al no haberse descrito brotes de GPT en la zona muestreada, asumieron que los anticuerpos detectados se debían a la infección por el CVRP, aunque no utilizaron ninguna técnica diferencial.

La inoculación del CVRP a cerdos receptivos provoca una respuesta inmunitaria humoral no diferenciable, por los métodos clásicos (seroneutralización (SN), inmunofluorescencia indirecta (IFI)) de la que se produce tras la infección con el VGPT. Esto ha provocado un problema en el diagnóstico serológico de ambas infecciones. La diferenciación entre las cepas clásicas del VGPT y el CVRP sólo ha sido posible

mediante la utilización de AcMs (Callebaut y col., 1988a), con el desarrollo de métodos de diagnóstico diferencial por enzimo o radioinmunoensayo, basados en la competición con AcMs (Callebaut y col., 1988b, 1989; Garwes y col., 1988; Laviada, 1991; Van Nieuwstadt y Boonstra, 1990) y, más recientemente, mediante la hibridación con sondas de DNA (Bae y col., 1991).

La primera confirmación serológica de la presencia del CVRP en España se realizó utilizando una prueba de enzimoimmunoensayo (ELISA) que diferencia los anticuerpos inducidos por el VGPT de los producidos por la infección con el CVRP (Lanza y col., 1990).

El CVRP induce un cierto grado de protección pasiva frente al VGPT, aunque existe una controversia en cuanto al grado de protección que es capaz de conferir.

2.1. CARACTERISTICAS DEL CVRP

El CVRP posee unas características muy similares a las del virus clásico de la GPT con algunas diferencias que se revisan a continuación.

2.1.1. Genoma

La organización global del genoma del CVRP es idéntica a la del VGPT, como se deduce de los datos disponibles de las secuencias de ambos virus (Rasschaert y col., 1990; Britton y col., 1991; Page y col., 1991). Los genomas del CVRP y del VGPT difieren entre si por deleciones, que afectan esencialmente al gen de la proteína S y a la ORF3a del CVRP, y mutaciones puntuales. Los dos virus muestran una divergencia en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de un 3%, lo que no es significativamente diferente de la observada entre dos cepas de VGPT.

Rasschaert y col. (1990) han comparado la secuencia nucleotídica del extremo 3' del genoma de una cepa de CVRP aislada en Francia (cepa RM4) con las secuencias

conocidas de tres cepas de VGPT: las cepas Miller y FS 772/70, ambas virulentas, y la cepa Purdue, atenuada. Comprobaron que existía una homología antigénica media del 96% entre el CVRP y las tres cepas del VGPT. Localizaron, también, dos diferencias notables entre el CVRP y el VGPT:

- El genoma del CVRP presenta una delección de 672 nts respecto al del VGPT, que hace que uno de las ORF no sea funcional. Esta ORF codifica una proteína no estructural en el VGPT de función desconocida.
- La proteína S codificada en el gen correspondiente del CVRP esta truncada respecto a la del VGPT.

Bae y col. (1991) han preparado una sonda de DNA complementario (cDNA) a partir del gen de la proteína S de la cepa Miller del VGPT. Esta sonda reconoce al VGPT y al CVC en una prueba de hibridación, pero no reacciona en las mismas condiciones con el CVRP, lo que implica que esa parte del gen de la proteína S esta modificada en el CVRP.

Wesley y col. (1991) encuentran también varias diferencias entre ambos virus cuando analizan genéticamente un aislado americano de CVRP y lo comparan con el VGPT:

- En células infectadas con el CVRP no se encuentra el RNA 3.
- El RNA 2 es mas pequeño en el CVRP: presenta una delección de 681 nts tras la base 62, otra delección de 227 nts tras los 6 primeros nts del extremo N-terminal, pero mantiene el péptido señal de 16 aa.
- El CVRP presenta dos delecciones más allá del gen que codifica para la proteína S.

Así mismo, Jackwood y col. (1992), encuentran estas mismas deleciones en otra cepa de CVRP americana. Las secuencias de ambos aislados americanos resultaron ser prácticamente idénticas. A pesar de que las deleciones difieren en localización de las encontradas en los aislados europeos, los genomas muestran las mismas alteraciones, es decir, un gen que codifica para una proteína S truncada en su extremo N-terminal y una ORF3a convertida en pseudogen.

Basándose en la secuencia del RNA, Sánchez y col. (1992) han determinado la relación genética existente entre seis aislados europeos de CVRP y seis aislados de VGPT. Los seis aislados del CVRP presentan una deleción idéntica que incluye los sitios C y B de la proteína S. Dos de los aislados de VGPT, con tropismo respiratorio, presentan mutaciones en la zona correspondiente a la deleción y se propone la posible implicación de esta zona en el sitio de unión a receptor que confiere tropismo entérico a los VGPT. Los autores proponen, así mismo, un árbol filogenético para 13 aislados entéricos y respiratorios. Según este, un linaje principal de virus evolucionó a partir de un progenitor que debía estar en circulación alrededor de 1941. De este se originaron linajes secundarios, siendo el último en aparecer el CVRP. La tasa estimada de fijación de mutaciones de $7 \pm 2 \times 10^{-4}$ sustituciones por nucleótido y año indica que los coronavirus relacionados con el VGPT tienen un grado de variabilidad semejante a otros virus RNA.

Probablemente, en la evolución han tenido lugar tanto mutaciones puntuales como recombinaciones. Las deleciones podrían haber aparecido debido a un mecanismo análogo a la recombinación ilegítima, debida a la tendencia de la polimerasa virica de parar y saltar de un RNA molde a otro (Lai, 1990), de modo que la polimerasa podría haber parado y saltado a otras partes de la misma molécula molde de RNA, delecionando así porciones internas del genoma. Los posibles mecanismos de evolución del CVRP a partir del VGPT y la implicación, en cuanto a la pérdida de enteropatogenicidad y cambio de tropismo, de los cambios genéticos acaecidos han sido recientemente revisados y discutidos por Laude y col. (1993).

2.1.2. Proteínas estructurales

Las proteínas N y M del CVRP parecen ser prácticamente idénticas a las del VGPT, ya que no se han encontrado diferencias en su tamaño ni en los genes que las codifican, así como tampoco antigénicamente con AcMs producidos frente a las proteínas N y M del VGPT (Laude y col., 1988; Sánchez y col., 1990).

Sin embargo, AcMs anti-N específicos del sitio A, localizado en la mitad amino-terminal de la proteína, muestran una buena reactividad cruzada, mientras que AcMs que definen el sitio B, localizado en la mitad carboxi-terminal, muestran una reactividad alterada frente a casi todos los aislados de CVRP analizados (Alonso y col., 1992). Estos resultados revelan la existencia de cierta heterogeneidad antigénica en la proteína N, no observada en el VGPT.

En cuanto a los epítomos presentes en la proteína M parece que están conservados entre el VGPT y el CVRP aquellos que son internos, mientras que AcMs dirigidos frente a epítomos presentes en la región N-terminal, protuberante en la envuelta exterior del VGPT, no eran capaces de reaccionar frente a ninguno de los tres aislados de CVRP estudiados (Laude y col., 1988). Estos resultados concuerdan con los datos de la secuencia de aa: las secuencias de 2 aislados de CVRP y de 2 cepas de VGPT son idénticas en los 64 aa carboxi-terminales, mientras que se encuentran 4 diferencias en los 30 primeros residuos N-terminales (Laude y col., 1987; Rasschaert y col., 1990; Britton y col., 1991). Además, en dos de estos cambios están implicados aa cruciales para la expresión de epítomos (Laude y col., 1992).

La proteína S del CVRP es más pequeña que su homóloga en el VGPT, estimándose un peso molecular de 175 kDa frente a los 220 kDa en el VGPT. Esta disminución del tamaño se debe a la delección presente en el genoma del CVRP, que hace que su peplómero esté truncado. La falta de parte de los aminoácidos en la proteína S del CVRP podría afectar directamente (estructura primaria), o debido al cambio conformacional (estructuras secundaria y cuaternaria), a la zona del peplómero

involucrada en el reconocimiento de los receptores del virus en los enterocitos (Rasschaert y col., 1990; Laude y col., 1993).

2.1.3. Estructura antigénica de la proteína S

El CVRP y el VGPT son antigénicamente indistinguibles utilizando reactivos policlonales. Un antisuero producido frente a uno de los dos virus tiene el mismo poder neutralizante para el virus homólogo que para el heterólogo, por lo que la prueba clásica de SN no puede discriminar la respuesta inmunitaria humoral inducida por uno u otro virus (Pensaert y col., 1986).

Callebaut y col. (1988a) tampoco encontraron diferencias en la estructura antigénica de las tres proteínas estructurales mediante "immunoblotting" (IB) con suero anti-CVRP o VGPT. Sin embargo, la utilización de AcMs en RIA permitió a estos autores la detección en el CVRP de modificaciones en tres de los sitios antigénicos definidos previamente en la proteína S del VGPT (Jiménez y col., 1986). Así, 5 AcMs no neutralizantes, dirigidos contra otros tantos epítopos situados en los sitios antigénicos B, C y D, no reconocieron al CVRP, lo que indica que estos determinantes antigénicos estaban ausentes o modificados en dicho virus. En cambio, todos los AcMs neutralizantes dirigidos contra el sitio A, reconocieron tanto al VGPT como al CVRP, lo que sugiere que la modificación de la proteína S del CVRP afecta sólo a los dominios antigénicos inductores de anticuerpos no neutralizantes.

Con otro panel de AcMs contra la cepa Purdue del VGPT e inmunofluorescencia indirecta, Laude y col. (1988) llegaron a una conclusión semejante. Compararon además la reactividad de los AcMs con tres cepas de CVRP de diferente origen geográfico (Francia, Bélgica y Dinamarca), sin encontrar diferencias entre los tres. Tres epítopos situados en la zona externa de la proteína N también estaban modificados en el CVRP, no siendo esta una característica diferencial frente al VGPT ya que una cepa británica virulenta de este virus (FS 772/70) presentaba la misma peculiaridad.

Al enfrentar la misma colección de AcMs al virus de la peritonitis infecciosa felina (VPIF), estos autores observaron que este virus era *antigénicamente más parecido* al CVRP que al VGPT. La ausencia de epítomos comunes en el sitio antigénico B de la proteína S, entre el CVRP y VPIF por un lado, y el VGPT por otro, hace pensar que esta zona del peplómero pueda ser determinante del tropismo celular del virus.

En un estudio sobre el grado de homología antigénica entre la cepa Purdue del VGPT y 25 aislados de coronavirus de diferentes especies (porcina, canina, felina, murina y humana), Sánchez y col. (1990) determinaron que el porcentaje de homología entre el VGPT y 8 cepas diferentes de CVRP oscilaba entre el 69 y el 83%. Ninguna de las cepas de CVRP difería del VGPT en el principal sitio antigénico inductor de anticuerpos neutralizantes (sitio A). Todas las cepas de CVRP tenían los sitios B y C modificados o ausentes.

Las diferencias antigénicas entre VGPT y CVRP no se limitan únicamente a epítomos presentes en el primero y ausentes en el último, sino que el CVRP posee determinantes antigénicos específicos, como lo demuestra el hecho de que AcMs inducidos por el CVRP no reconozcan epítomos del VGPT (Rasschaert y col., 1990).

2.2. EPIDEMIOLOGIA DE LA INFECCION POR EL CVRP.

El CVRP se multiplica en el aparato respiratorio del cerdo, alcanzando altos títulos, que favorecen la diseminación aerógena de la infección. La capacidad de difusión del virus es enorme, lo que ha hecho que la mayoría de las explotaciones de muchos países estén infectadas.

Los primeros casos de animales infectados por el CVRP se detectaron en Bélgica en 1984. La difusión del CVRP en este país ha sido muy rápida (Pensaert y Cox, 1989; Pensaert y col., 1986) y su diseminación por todo el territorio europeo ha sido explosiva.

Pensaert y Cox (1989) consideran que actualmente en Bélgica la infección se mantiene de forma enzoótica en las explotaciones, estando la práctica totalidad de ellas infectadas. En el Reino Unido, aparte de un caso aislado en 1984 restringido a una sola granja (Brown y Cartwright, 1986), la seroconversión masiva de cerdos se detectó a partir de 1986 (Brown y Cartwright, 1986).

En Francia los primeros datos que confirman la difusión del CVRP son de 1987 (Jestin y col., 1987a, 1987b; Vannier y col., 1987) y en este caso se relaciona con la aparición de sintomatología respiratoria. La difusión del CVRP también fue explosiva en Dinamarca, país libre de GPT (Henningsen y col., 1988), a partir de los primeros casos detectados en 1984. La presencia del CVRP se ha demostrado en Holanda (Van Nieuwstadt y Pol, 1989), Alemania (Lange y col., 1988), Suiza (Bereiter y col., 1988), Austria (Möstl y col., 1989), la antigua Checoslovaquia (Valencak y col., 1990) y España (Rubio y col., 1987; Yus y col., 1989). Un estudio epidemiológico en España (Lanza, 1991) ha confirmando que el CVRP se ha difundido muy rápidamente en nuestro país, de forma semejante a otros países europeos.

Esta rápida difusión dentro y entre los distintos países, incluso en países con altos estándares higiénicos, como Dinamarca en que la infección fue primero observada a lo largo de la frontera con Alemania y posteriormente fue progresando hacia el interior del país, hace pensar que la difusión del virus sea por vía aerógena. Inoculaciones experimentales con el CVRP han demostrado que el virus en forma de aerosol es capaz de iniciar fácilmente la infección del tracto respiratorio, produciéndose aquí grandes cantidades de virus, que son excretadas en los fluidos nasales. No existen indicaciones de que la vía de transmisión heces-oral juegue un papel en la infección natural y la transmisión mecánica por los operarios, el calzado o los camiones parece carecer de importancia en la difusión del virus.

Un estudio epizootiológico llevado a cabo en Bélgica durante los años comprendidos entre 1989 y 1990, indica que durante el otoño, cuando las condiciones ambientales son de una elevada humedad, se producen oleadas de infección por este

virus (Pensaert y col., 1992), lo que también ha sido observado en otros países como Francia (Jestin y col., 1987a; Laval y col., 1991). Por lo tanto, parece claro que tanto las circunstancias estacionales como la densidad de cerdos y la distancia entre las granjas influyen en la epizootiología del CVRP.

En EE.UU. se ha aislado una variante independiente, CVRP-Ind/89. Esta cepa de CVRP presenta características semejantes a las europeas, aunque su poder de difusión parece ser menor (Wesley y col., 1990).

2.3. PATOGENIA

El lugar de multiplicación primaria del CVRP es el aparato respiratorio del cerdo, donde replica pudiendo alcanzar títulos de hasta 10^8 DICC₅₀ (dosis infectiva 50 en cultivo celular) por gramo de tejido pulmonar (Cox y col., 1990). El virus presenta tropismo por las células epiteliales del pulmón, y de la mucosa de las fosas nasales, traquea, bronquios y bronquiolos. También se ha detectado replicación vírica en los macrófagos alveolares y en las tonsilas (Cox y col., 1990; Pensaert, 1989; Pensaert y Cox, 1989), así como en las células epiteliales no ciliadas que tapizan la mucosa de los bronquiolos (O'Toole y col., 1989). Tras la multiplicación primaria, se produce una viremia, aislándose el virus de hígado, bazo y ganglios linfáticos, no detectándose replicación vírica en estos órganos (Cox y col., 1990; Pensaert y Cox, 1989). El CVRP no atraviesa la barrera placentaria (Paton y Brown, 1990).

Los estudios iniciales de Pensaert y col. (1986) indicaron que el CVRP no era capaz de multiplicarse en el intestino tras la inoculación mediante aerosol. Estudios posteriores han mostrado que la gran cantidad de virus producido en el aparato respiratorio es deglutido y alcanza el intestino delgado (Cox y col., 1990; O'Toole y col., 1989; Pensaert, 1989) dando lugar allí a una infección productiva. Aquí se multiplica primero en el íleon, extendiéndose después la infección hacia el yeyuno y duodeno (Cox y col., 1990).

Se ha demostrado que, en el intestino, las células diana del CVRP tras la inoculación intrainestinal o por aerosol, son los enterocitos. La replicación en estos es más limitada que la del virus de la GPT y no provoca el acortamiento de las vellosidades intestinales. Además, se requieren dosis mucho mayores de CVRP que de VGPT (dosis mayores de 10^3 DICC₅₀) para inducir una infección productiva en el intestino (Pospischil y col., 1990).

3. INMUNIDAD FRENTE AL VIRUS DE LA GPT

Dada la alta mortalidad que genera, la ausencia de un tratamiento eficaz y la limitada efectividad de las vacunas disponibles la GPT es una de las enfermedades más devastadoras de los cerdos recién nacidos por lo que el interés se centra principalmente en proporcionar **inmunidad pasiva o lactogénica** (Moxley y Olson, 1989; Moxley y col., 1989).

La inmunidad humoral parece ser determinante en la protección frente a la GPT aunque la inmunidad celular probablemente juegue un papel complementario, si bien, está menos estudiada.

Dado que la patogénesis de la GPT se debe, en esencia, a que los enterocitos del yeyuno son destruidos o su función es alterada como consecuencia de la infección con el virus, la inmunidad frente a la enfermedad dependerá primordialmente de una adecuada protección de las células epiteliales del intestino delgado.

3.1. INMUNIDAD DE MUCOSAS

El epitelio del intestino delgado forma parte del sistema de mucosas del organismo. Las mucosas son las partes del organismo más susceptibles a la infección, por carecer de la defensa natural de la piel y constituyen las áreas orgánicas que mantienen un contacto más estrecho entre el sistema inmune y los múltiples antígenos

extraños que están continuamente presentes en el medio exterior. Presentan, sin embargo, un sistema inmune que, aunque correlacionado con el sistémico, forma un componente separado de este; así como una serie de barreras no inmunológicas que confieren una protección frente a bacterias, virus y toxinas.

El sistema inmune de las mucosas ha sido revisado ampliamente por varios autores (Welliver y Ogra, 1978; Porter, 1986; Heyworth y Jones, 1988; Targan y Shanahan, 1990; Escibano, 1991; McGhee y col., 1992).

3.1.1. Mecanismos no inmunitarios de defensa de mucosas.

En el tracto gastrointestinal existen numerosas barreras no inmunológicas que evitan que determinados agentes patógenos alteren su superficie o penetren en el organismo (Opdebeeck, 1982; Escibano, 1991). Los principales son los ácidos gástricos, las proteasas pancreáticas, el peristaltismo, la cubierta mucosa, y la composición e integridad de la membrana del enterocito.

La cubierta mucosa constituye una barrera mecánica contra la penetración de microorganismos hasta la superficie del epitelio. El moco es producido por las células globosas y su producción es incrementada mediante el estímulo de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo. La mucosa puede actuar, además, anclando inmunoglobulinas (Igs) secretoras, aumentando así su eficacia en la captura de antígeno y prolongando su vida dentro del tracto intestinal.

Algunos de estos mecanismos no inmunitarios sufren cambios en el proceso de maduración del animal de forma que, por ejemplo, la composición de carbohidratos de las glicoproteínas que forman el moco intestinal es diferente en animales recién nacidos con respecto a los adultos. Diferencias similares ocurren en la composición de las membranas de las células epiteliales que componen las vellosidades. Estos cambios de maduración consisten fundamentalmente en la proporción de lípido-proteína, la cual es más favorable a los lípidos en animales recién nacidos, provocando una estructura más

desorganizada. Todos estos cambios pueden afectar a propiedades tan importantes como el tráfico de macromoléculas (Igs, componentes alimenticios) a través de los enterocitos en el caso de los animales recién nacidos, o la expresión de receptores para virus, bacterias o toxinas según la edad del animal. En la actualidad, por tanto, es de gran interés científico el estudio de aquellos factores que modulan la maduración intestinal y que una vez conocidos podrían ayudar a disminuir el riesgo de contraer determinadas enfermedades en los animales neonatos.

3.1.2. El sistema inmune de las mucosas.

El sistema inmune de mucosas, caracterizado por Acs de clase IgA secretora (IgA-S) como principal factor de defensa humoral, esta constituido por tejido linfoide especializado donde los antígenos del medio ambiente se ponen en contacto con el organismo, son absorbidos e inducen respuestas tanto T como B.

El sistema inmune de mucosas, altamente especializado, abarca tanto el tejido linfoide de las mucosas como las glándulas exocrinas y presenta todos los componentes de un sistema inmune: linfocitos, macrófagos, células presentadoras de antígeno (APC), etc., capaces de desencadenar y mediar una respuesta inmunitaria eficaz, tanto humoral como celular.

El sistema inmune de mucosas puede ser dividido en dos partes en base a su morfología y función. La primera estaría constituida por un tejido linfoide organizado de los tractos respiratorio y entérico donde tiene lugar el encuentro con el antígeno. El segundo compartimento inmunitario estaría formado por un tejido linfoide difuso ampliamente difundido bajo las células epiteliales de la mucosa, lámina propia de los tractos intestinal, respiratorio y genitourinario, así como en distintas glándulas secretoras como mamas, glándulas salivares, y en menor grado bazo y ganglios linfáticos.

El primer tipo se denominan tejidos eferentes y en ellos tiene lugar la activación y diferenciación iniciales. El segundo tipo son los tejidos aferentes, donde los antígenos

interaccionan con células y provocan una diferenciación final produciendo tanto Acs como reacciones citotóxicas. En estos últimos se encuentran las células plasmáticas y es donde tiene lugar la producción de IgA-S resulta en protección inmunológica local.

Actualmente es bien conocido que los antígenos externos medioambientales, que son introducidos principalmente por ingestión o inhalación, se encuentran con los tejidos linfoides especializados de los tractos gastrointestinal (GI) y respiratorio superior. Estos son denominados **GALT** y **BALT** respectivamente ("gut-associated y bronchus-associated lymphoid tissue"). El GALT esta colectivamente representado por las **Placas de Peyer** (PP), el apéndice y pequeños nódulos linfoides solitarios. El BALT comparte muchas similitudes anatómicas con el GALT y, probablemente ejerce las mismas funciones que este en el tracto respiratorio (Bienenstock, 1980; Porter, 1986).

3.1.2.1. Absorción de antígenos y presentación antigénica

Pequeñas pero detectables cantidades de antígenos presentes en los alimentos pueden acceder a la circulación sistémica. Esta absorción es mucho mayor en animales neonatos, favorecida por la mayor proporción lípido/proteína de la membrana del enterocito que antes se mencionaba, o en aquellos animales que tienen alterada la integridad de la mucosa. Parecen existir tres rutas principales para la absorción de antígenos:

- A través de las uniones entre células epiteliales. Este mecanismo tendría importancia en caso de alteración de la integridad de la membrana o en procesos inflamatorios.
- A través de las vellosidades en el proceso de maduración y migración de las células epiteliales al sustituir a las antiguas células que tapizaban el extremo de la vellosidad.

- A través de la célula epitelial, la cual es una célula altamente especializada que puede absorber, transportar, procesar y digerir macromoléculas. Las moléculas que sufren endocitosis mediada por receptor escapan a la digestión de los lisosomas y son liberadas intactas al espacio intercelular. Parece ser este último el mecanismo que opera en los animales neonatos.

Cualquier respuesta inmunitaria requiere la estimulación de las células inmunoreaccionantes mediante el procesamiento y presentación de los antígenos por las células apropiadas. El antígeno puede ser internalizado por una célula presentadora, degradado y reexpresado sobre la superficie de dicha célula asociado al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II o, por otra parte, ser sintetizados en el interior de la célula presentadora (proteínas víricas o antígenos tumorales) en cuyo caso se expresan asociados al MHC de clase I (Marrack y Kappler, 1986; Bierer y col., 1989). Parece demostrado que los enterocitos pueden expresar antígenos de tipo II en su superficie, y esta expresión puede ser incrementada por la presencia de IFN. La expresión de estos antígenos, así como el gran número de estas células existente en el intestino, parece indicar que estas células podrían jugar un papel muy importante como células presentadoras de antígeno a los linfocitos presentes en la mucosa intestinal.

La presencia de gran cantidad de células T CD8+ intraepiteliales con una posible actividad supresora hace que se especule sobre la función de los enterocitos en los mecanismos de inducción de tolerancia oral a determinados antígenos, fenómeno este de gran importancia en la inmunidad de mucosas. El enterocito, además, juega otro importante papel en la inmunidad de mucosas produciendo componentes secretores y transportando Igs secretoras desde la lámina propia al lumen intestinal (Porter, 1986).

Además, existe otro mecanismo específico de tráfico de antígenos en mucosas. Las PP contienen unas regiones, llamadas **dome**, ricas en linfocitos, macrófagos y algunas células plasmáticas. Estas áreas están cubiertas por un epitelio especializado compuesto por las llamadas **células M** ("microfold cells") o células epiteliales asociadas a los folículos (Wolf y Bye, 1984). Estas son unas células epiteliales especializadas que

tienen actividad pinocítica y que se caracterizan por un citoplasma elongado y una reducción de las microvellosidades. Estas células tienen la función especial de fagocitar, sin procesar (ya que no poseen lisosomas), antígenos intraluminales, por ejemplo antígenos víricos, que presenta a las células inmunitarias subyacentes, alrededor de las cuales presentan pequeñas extensiones. Las células M han sido propuestas como el tipo celular mas importante implicado en la internalización de antígenos en el intestino. Tampoco ha sido posible la demostración de antígenos de clase II en su superficie, lo que refuerza la idea de que tengan como única misión el transporte de antígenos intactos.

Estos datos sugieren que la presentación de antígenos en el intestino se realiza dentro de los propios folículos linfoides. Los macrófagos capturarían el antígeno facilitado por las células M y lo transportarían al interior de las PP. Células T y B primadas por antígenos han sido identificadas en el interior de las PP pero no en la lámina propia, lo que refuerza esta hipótesis. Dentro de la placa de Peyer existen tres posibles células presentadoras: células dendríticas, macrófagos y células B, con funciones similares a las desempeñadas en el sistema inmune sistémico.

3.1.2.2. Activación y migración de linfocitos.

Para que un antígeno desencadene una respuesta inmunitaria ha de ser reconocido como extraño, procesado y presentado, asociado al MHC, a los linfocitos T. Estos juegan un papel decisivo, una vez estimulados, en la regulación, activación, y maduración de linfocitos B, así como en la activación de monocitos y en la diferenciación de células T. Los linfocitos B, sin embargo, pueden reaccionar también frente a antígenos solubles. Por tanto, en el sistema inmune de mucosas puede haber diferentes niveles de respuesta inmunitaria.

La primera sería la respuesta de células B frente al antígeno, y una respuesta más selectiva mediada por linfocitos T, generando una respuesta inmunitaria coordinada. En el sistema inmune de mucosas los linfocitos B expresan principalmente IgA en su

superficie (la IgA-S constituye más del 80% de todos los anticuerpos producidos en los tejidos asociados a la mucosa) (McGhee y col., 1992) como respuesta a interacciones celulares, probablemente específicas del sistema inmune de mucosas, y no totalmente comprendidas todavía. Estas interacciones incluyen a células que componen el estroma, células dendríticas y células T-clase específicas de las mucosas que actúan mediante contacto directo con los linfocitos B en estado de diferenciación o mediante la producción de citoquinas o linfoquinas.

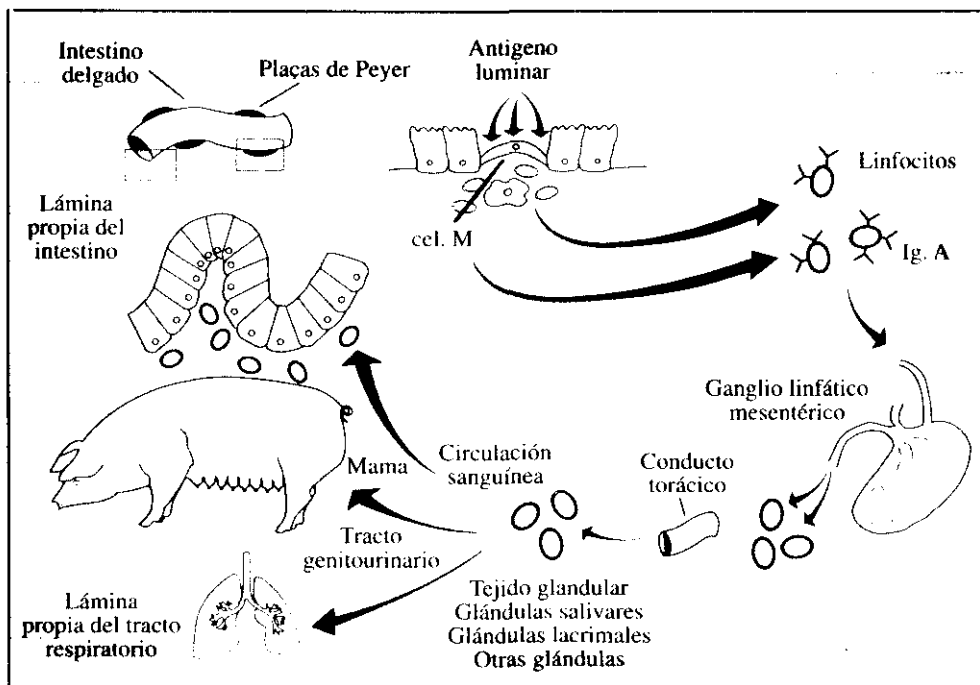


Figura 3.- Recirculación de células dentro del sistema inmune de las mucosas. (Tomado de De Diego y col., 1992b).

Una característica primordial de este sistema inmunitario es lo que se ha venido en llamar la **recirculación de linfocitos**. Al llegar el antígeno a la mucosa entra en contacto, como hemos visto, con el tejido linfoide asociado donde se produce una respuesta inmunitaria local, principalmente de clase IgA-S. Los linfocitos así

estimulados salen vía vasos linfáticos eferentes, pasan a los ganglios mesentéricos y de estos, por el conducto torácico, al torrente circulatorio desde donde son repartidos a todas las mucosas y glándulas exocrinas, donde maduran y ejercen funciones efectoras. Esto es posible gracias a que los linfocitos de este sistema inmunitario de mucosas tienen unos receptores llamados de "homing", es decir, presentan tropismo por las mucosas (Duijvestijn y Hamann, 1989). (Fig. 3).

3.1.2.3. Regulación de la producción de IgA

3.1.2.3.1. Regulación por linfocitos T

Elson y col. (1979) mostraron por vez primera que células T podían jugar un papel directo en respuestas IgA mediante experimentos con células T procedentes de PP activadas con concanavalina A (ConA). La adición de estas células activadas a células B esplénicas o procedentes de PP, estimuladas con LPS, resultó en aumentos de la síntesis de IgA del orden de cuatro a seis veces, mientras que la síntesis de IgM e IgG fue suprimida. Por otro lado, células T de bazo activadas con Con A suprimieron la síntesis de IgA. Estos resultados, así como los obtenidos posteriormente por Kawanishi y col. (1982, 1983) indican la existencia de una subpoblación de células T, presente en PP pero ausente en bazo, que regula el cambio de clase, aumentando el número de células IgA⁺, pero incapaces de inducir la diferenciación de estas células en células plasmáticas secretoras de IgA.

En otros trabajos (Kiyono y col., 1983) se demostró la existencia de una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ que interaccionan selectivamente con linfocitos B IgA⁺ e inducen la transformación de estas en células secretoras de IgA. Una de las características fundamentales de estos linfocitos CD4⁺ específicos de clase es la expresión de receptores para la fracción Fc de la IgA (Fc α R) (Kiyono y col., 1982, 1984), aunque todavía se desconoce el papel exacto que juega dicho receptor en esta inmunoregulación específica de clase.

3.1.2.3.2. Regulación por citoquinas

Las citoquinas son importantes en las respuestas IgA y pueden dividirse en dos categorías. La primera incluye las citoquinas que influyen el cambio de clase a IgA, y la segunda incluye aquellas que inducen la diferenciación de células IgA+ en células plasmáticas (McGhee y col., 1992). Existe suficiente evidencia que demuestra que el "Transforming Growth Factor" (TGF)- β induce en células B IgM-S+ el cambio a IgA-S+ (Coffman y col., 1989; Sonoda y col., 1989). Por otro lado, se ha demostrado que las interleuquinas IL-5 e IL-6 son efectivas en la inducción de la síntesis de IgA actuando sobre la diferenciación de células B IgA+ en células secretoras de IgA, siendo IL-6 más efectiva que IL-5 (McGhee y col., 1989, 1992; Beagley y col., 1988, 1989; Schoenbeck y col., 1989).

3.2. INMUNIDAD FRENTE AL VGPT

La información disponible hasta el momento indica que una **inmunidad activa** frente a la GPT ocurre únicamente como resultado de una infección del tracto intestinal. Cerdos que se han recuperado de una infección intestinal con VGPT virulento quedan, por lo general, clínicamente protegidos frente a una nueva infección.

El virus virulento es relativamente eficiente en la inducción de resistencia a una infección subsecuente, y, por tanto, tan sólo virus virulentos inoculados por vía oral son capaces de conferir protección. Por el contrario, virus atenuados administrados por vía oral o parenteral, intramuscular (IM) o subcutánea, no son capaces de proporcionar una defensa inmuninmunitaria suficiente y la resistencia a la contraprueba es altamente variable (Bohl y Saif, 1975; Voets y col., 1980; Henning y Thomas, 1981; Moxley y Olson, 1989).

Este fracaso es atribuido por algunos investigadores a la inadecuada replicación del virus en el intestino de los animales inoculados (Moxley y Olson, 1989). También se ha especulado con la posibilidad de que algunos epítomos protectores puedan ser

perdidos durante el paso continuado del virus en cultivo celular, necesario para la atenuación de este (Welch y Saif, 1988).

No sólo los virus atenuados presentan una inmunogenicidad reducida. Empleando la ruta IM para la administración de virus virulento en muchos casos se ha tenido éxito en la obtención de una buena respuesta inmunitaria humoral sistémica, pero casi uniformemente esta respuesta falla a la hora de proporcionar una protección satisfactoria. Es más, cerdos que han recibido inyecciones IM de virus atenuado presentan altos títulos de Ac neutralizantes en suero pero la mayoría desarrollan signos clínicos cuando son inoculados oralmente con virus virulento (Bohl y col., 1975).

Así pues, los Ac circulantes, adquiridos bien activa o bien pasivamente, proporcionan poca o ninguna inmunidad (Harada y col., 1969; Moxley y col., 1989). La resistencia frente a esta infección parece estar mediada, en cambio, por una buena inmunidad humoral local en la superficie epitelial del intestino.

Dado que no existen tratamientos eficaces, que la mayor mortalidad debida a la GPT se produce en cerdos recién nacidos y que estos no poseen anticuerpos maternos - ya que en cerdos no hay una transferencia selectiva de Igs de la circulación materna a la fetal durante el último tercio de la gestación (Newby y col., 1982; Porter, 1986) - tiene gran importancia para la supervivencia de los lechones la transferencia de inmunidad que se efectúa a través de calostro y leche: inmunidad pasiva o, como Haelterman (1965) la llamó, **inmunidad lactogénica**. Esta es de primordial importancia en proporcionar a los lechones recién nacidos una protección inmediata frente a una infección vírica de GPT (Pensaert, 1979; Bohl, 1981). Además, la rápida progresión de los cambios patológicos asociados con este agente infeccioso hace que la inmunización activa de estos animales sea insuficiente.

3.2.1. Generación de la respuesta inmunitaria protectora

En este sentido, es bien conocido el hecho de que cerdas que se han recuperado de una infección por VGPT desarrollan inmunidad frente al virus y confieren protección pasiva a los lechones. Estos quedan protegidos frente a la enfermedad gracias a los anticuerpos ingeridos en el calostro y la leche, principalmente de la clase IgA (Bohl y col., 1972; Bohl, 1981; Moxley y col., 1989). Esto se debe a la estimulación local del sistema inmune de mucosas. De aquí la importancia de la vía de inoculación, que ha de ser oral. Así, la inoculación oral experimental de VGPT no atenuado en cerdas gestantes ha resultado generalmente en niveles protectores de inmunidad activa para la cerda y pasiva o lactogénica para los lechones. La duración de esta inmunidad es bastante variable pero generalmente se estima que persiste aproximadamente entre 9 y 12 meses.

Por el contrario, y al igual que ocurre con la inoculación IM de virus virulento, con virus atenuado por pases en cultivo se ha descrito una inmunogenicidad reducida. La vacunación oral con virus vivo atenuado induce la producción de Acs neutralizantes pero no estimula una buena inmunidad lactogénica a lechones (Bohl y col., 1975). (Fig. 4)

Por otro lado, la inyección intramamaria (IMM) de virus GPT atenuado en cerdas en período de lactación ha sido una vía de inoculación experimental que ha dado buenos resultados en cuanto a índices de protección de los lechones (Djurickovic y Thorsen, 1970; Thorsen y Djurickovic, 1971); probablemente debido a la estimulación local del tejido linfoide asociado. En cuanto a la clase de Ig producida, se ha detectado tanto IgA como IgM en la leche de estas cerdas. Inyecciones similares en cerdas gestantes producen un título alto de IgG en la leche (Saif y Bohl, 1983; Abou-Youssef y Ristic, 1975). Parece que existe una recircularización de linfocitos IMM pues cuando se inocula el virus en algunas glándulas no se encuentran diferencias en el título de anticuerpos de la leche de glándulas inoculadas de la de glándulas no inoculadas (Bourne y col., 1975).

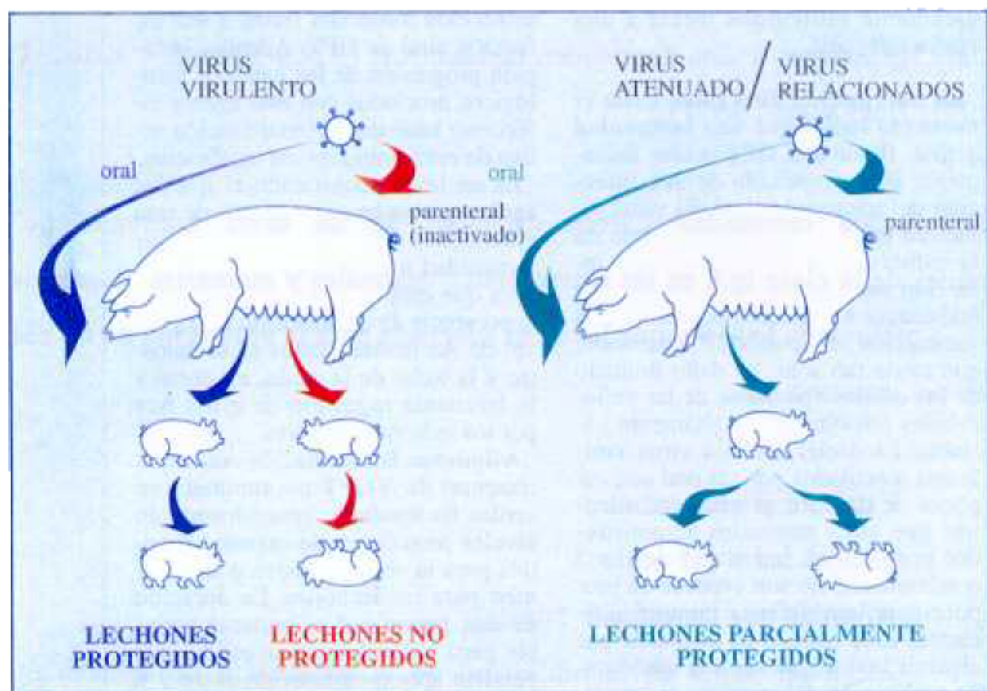


Figura 4.- Inmunidad pasiva frente al VGPT. (Tomado de De Diego y col. 1992b).

En un intento de definir mejor el mecanismo para proporcionar inmunidad tanto activa como pasiva frente a la infección entérica con el VGPT se ha prestado atención a la presencia y papel de las distintas clases de Ig en las secreciones intestinales y mamarias cuando el virus es administrado por diferentes rutas (Bohl y Saif, 1975). Los estudios sobre la respuesta inmunitaria de cerdas que han sido expuestas a preparaciones víricas de GPT por diferentes rutas han proporcionado los siguientes resultados y conclusiones:

- En una infección natural u oral experimental con VGPT virulento los Acs neutralizantes en calostro están siempre asociados tanto con Acs de la clase IgA como de la clase IgG (Bohl y col., 1972).

- Cuando virus virulento o atenuado es inyectado por vía IM y cuando esto no resulta en una infección del tracto intestinal, los Ac específicos frente a GPT resultantes en las secreciones mamarias son principal, sino únicamente, de la clase IgG, cuyos títulos descienden rápidamente (Abou-Youssef y Ristic, 1972, 1975; Bohl y col., 1975)

Una buena inmunidad parece depender de un nivel adecuado de Ac neutralizantes de la clase IgA en las secreciones intestinales y mamarias. Las posibles ventajas que presenta la IgA-S y que la hacen adecuada para la protección de las células epiteliales del intestino son:

- Estabilidad enzimática.
- Estabilidad a pH ácido.
- Afinidad por superficies mucosas.
- Juega un papel en la inhibición de la adherencia de agentes patógenos a las superficies mucosas.

Por el contrario, la IgG es mucho más sensible a pH ácido y se inactiva rápidamente a su paso por el estómago del cerdo. Así mismo, es más sensible a la hidrólisis por las enzimas proteolíticas del sistema gástrico y, por tanto, no retiene la actividad neutralizante durante el paso por el sistema digestivo donde el VGPT se replica (Underdown y Dorrington, 1974; Stone y col., 1979; Nagura y col., 1978). No obstante, algunos autores han demostrado que no siempre una buena inmunidad pasiva depende de la IgA-S. Anticuerpos de tipo IgG pueden llegar a conferir un buen nivel de protección, similar al conferido por la IgA-S, siempre y cuando una gran cantidad y/o una alta afinidad así como una gran actividad neutralizante frente al virus permitan compensar la fuerte degradación proteolítica que sufren estos en el intestino (Abou-Youssef y Ristic, 1975; Stone y col., 1977).

La unión de los anticuerpos puede convertir a un virus en no infeccioso siendo este uno de los principales mecanismos de defensa frente a las infecciones víricas. Los

mecanismos de neutralización de virus son complejos y no se han establecido todavía reglas generales. La reacción depende en gran manera de la naturaleza de los tres elementos participantes, esto es, el virus, el Ac y la célula huésped. La neutralización del virus puede ser conseguida por inhibición de cualquier paso en la replicación del virus. En muchos casos se ha demostrado que los Ac neutralizantes actúan impidiendo la unión, la penetración, la desencapsidación o la transcripción del virus.

El VGPT puede ser neutralizado por Ac específicos. En los coronavirus la proteína S es la responsable de la inducción de Ac neutralizantes. Como ya se ha revisado, se han descrito 4 sitios antigénicos, uno de los cuales (sitio A) es dominante y contiene epítomos conformacionales conservados implicados en neutralización. Este sitio ha sido dividido en 3 subsitios antigénicos y 8 epítomos críticos. Esta información fue obtenida originalmente con AcMs de origen murino, pero se ha demostrado que, en cerdo, los Acs neutralizantes también reaccionan con los mismos sitios antigénicos. En el VGPT únicamente la glicoproteína S ha sido implicada en la neutralización del virus en ausencia de complemento. Además, la neutralización del virus mediada por anticuerpos y dependiente de complemento se ha descrito con AcMs específicos de la proteína M.

Algunos investigadores han sugerido que la neutralización *in vitro* del VGPT por IgA de la leche o IgG del suero se debe a la inhibición de la internalización del virus adsorbido, pero no por bloqueo de la unión del virus a la célula huésped (Nguyen y col., 1986). Sin embargo, otros autores (Suñé y col., 1990) han demostrado que el virus puede ser neutralizado *in vitro* en los tres pasos: unión a la célula, internalización y en alguna etapa posterior a esta, en función de la concentración de Ac. Según estos autores, la neutralización del VGPT es un fenómeno específico y requiere que el epítomo implicado en la neutralización esté localizado en el contexto estructural adecuado. Los mecanismos de neutralización por AcMs fueron caracterizados con concentraciones alta, media y baja de Ac con respecto a la concentración de virus. Bajo estas condiciones, quedaban inhibidos principalmente tres pasos en el ciclo de replicación: unión del virus a la célula, internalización, y un paso posterior a la internalización. Además, estos

autores describen que la agregación de virus puede ser responsable de la neutralización de un 10 a un 20% de la infectividad vírica.

Ya que el calostro de una cerda inmune administrado regularmente a los lechones es capaz de proteger a estos, epítomos críticos en protección en VGPT virulento deben ser neutralizados en la luz del tracto intestinal. Dado que los Acs frente a epítomos críticos en protección están presentes en calostro y suero inmunes, la combinación apropiada de los AcMs adecuados que muestren grados paralelos de protección pasiva identificarían estos epítomos críticos. No obstante, AcMs neutralizantes administrados por vía oral a lechones no son capaces de proteger a estos de una infección con VGPT virulento (Wesley y col., 1988).

Durante el período que sigue inmediatamente al nacimiento la Ig materna es adquirida del calostro (Butler y col., 1981). Determinados factores presentes en el calostro pueden influir en la absorción de Ig o ayudar a prevenir su degradación proteolítica. La absorción de Ig del calostro por las células epiteliales intestinales es un proceso no selectivo que dura tan solo 24 a 48 horas; es por esto que la presencia de Acs neutralizantes en la luz del intestino delgado, continuamente proporcionados en la leche, parecen ser primordiales a la hora de conferir protección a los lechones (Newby y col., 1982; Salmon, 1989). El calostro se encuentra enriquecido en IgG e IgM en comparación con el suero, lo que provee al lechón de ambos tipos de Igs en el torrente circulatorio durante las primeras 24 a 36 horas después del nacimiento. En la glándula mamaria productora de calostro operan unos mecanismos altamente específicos que causan la acumulación en el calostro de altas concentraciones de IgG (en comparación con las concentraciones de IgA e IgM) (Curtis y Bourne, 1971). La concentración de IgG disminuye aproximadamente 30 veces durante la primera semana de lactancia, mientras que la de IgA disminuye únicamente 3 veces, convirtiéndose así en la clase predominante de Ig en la leche de cerda. Este cambio se completa 1 semana después del parto, tras la cual la IgA-S constituye un 50-60% de la Ig total en la leche e IgG un 20-30% (Bourne y Curtis, 1973).

Las Igs que forman el calostro y la leche provienen fundamentalmente de la transudación que se produce desde la sangre a la secreción mamaria. Sin embargo, existe una producción local de Igs en la propia glándula mamaria, la cual enriquece las secreciones lácteas. La producción local de Igs comienza antes del parto en la cerda, alrededor del día 80 de gestación, siendo las células plasmáticas productoras de IgA aquellas que predominan sobre las que producen IgG e IgM. Los niveles de estos dos tipos de Igs (G y M), predominantes en calostro y leche de los primeros días tras el parto, dependen de la transferencia que de ellas se efectúa desde el suero. Así pues, la inmunidad sistémica determina los niveles de IgG e IgM calostrales. En contraste, la IgA, así como el restante 40% de las Igs G y M calostrales, se debe a la síntesis que de dichas Igs se efectúa en la propia glándula mamaria (Bourne y Curtis, 1973; Dahlgren y col., 1989).

Como ya se vio en los apartados anteriores las células plasmáticas productoras de los diferentes clases de Ig, y que producen anticuerpos en la mama, provienen de mucosas (intestinales sobre todo), en las cuales se efectuó el contacto entre el antígeno, la célula presentadora y las células efectoras. La migración de linfocitos B en fase de diferenciación desde el intestino a la glándula mamaria parece también estar regulado por el sistema endocrino, de forma que estrógenos, progesterona y prolactina incrementarían la migración de estos linfocitos (Salmon, 1989).

Recientemente se ha demostrado la absorción específica de células linfoides (células inmunocompetentes funcionales que incluyen macrófagos y linfocitos T y B) que acompañan al calostro por cerdos recién nacidos. Estas células parece que son absorbidas sólo por los cerdos de su propia madre, y las células son transportadas a través de los vasos linfáticos hasta los ganglios linfáticos mesentéricos. Esta absorción es aparentemente intercelular. Este hallazgo podría implicar que la transferencia de células de la cerda al lechón confiere una inmunidad celular activa en el cerdo recién nacido (Tuboly y col., 1988).

El problema en el desarrollo de protección contra la infección parece estar asociado, por tanto, con la clase de Ig cuya producción es estimulada. La infección del tracto intestinal resulta predominantemente en producción local y secreción de IgA que neutraliza al virus en la luz del intestino pero poca o ninguna IgG es secretada al lugar de la infección, mientras que la inoculación parenteral del virus resulta en altos títulos de IgG, pero no de IgA, en secreciones (Bohl, 1972; Kodama y col., 1980; Sprino y Ristic, 1982; Katak y Cooperstock, 1991).

La aparente dependencia de la inducción de inmunidad de la vía de introducción del virus se atribuye a la diferente clase de Ig que se produce debido al distinto procesamiento y presentación a las células inmunocompetentes en cada sistema: sistema inmune central y sistema inmune de las mucosas. La ingestión del virus, la ruta natural por la que los cerdos se exponen al patógeno, resulta en la infección de células epiteliales de las vellosidades intestinales. Se cree que los macrófagos en las cercanías de las PP procesan el virus y lo presentan a linfocitos B migratorios, que aquí sensibilizados y comprometidos a la secreción de IgA van a anidar ("homing") a las glándulas secretoras: **vínculo inmunológico intestino-mama**, responsable de la inmunidad lactogénica. De este modo el virus estimula la síntesis de cantidades relativamente altas de IgA que son secretadas a la leche. Localmente los linfocitos secretan IgA a la luz intestinal. Cuando el virus es inoculado por vía IM, sin embargo, los ganglios linfáticos regionales son los encargados del procesamiento de los antígenos y secreción, por parte de las células plasmáticas, de los Acs. Estos son predominantemente de la clase IgG y se detectan en relativamente altas concentraciones de actividad neutralizante circulante. Las Igs de la sangre se concentran en el calostro de una cerda gestante pero muy poco o nada va a la leche o a las secreciones intestinales.

Frederik y Bohl (1976) demostraron que una exposición parenteral (inyección subcutánea) a una cepa atenuada activa únicamente los linfocitos sistémicos (bazo) pero no los linfocitos de la lámina propia intestinal, lo que corrobora la idea de que la inmunidad, tanto humoral como celular, tras inoculación parenteral está restringida al

sistema inmune sistémico. Por ello se sugiere que el fallo de las vacunas con VGPT atenuado pueda ser atribuido en parte a una falta de activación de una inmunidad mediada por células significativa en el intestino. Los resultados obtenidos por Ernst y col. (1988) parecen apuntar en este mismo sentido cuando, estudiando el papel de células T en la regulación de la síntesis de IgA, encuentran que células obtenidas de bazo inducen respuestas fundamentalmente de clase IgG, mientras que células de las PP seleccionan respuestas IgA.

Se ha demostrado que la infección de la mucosa intestinal por virus enteropatógenos desencadena varios tipos de mecanismos de defensa local que implican Acs así como respuestas inmunitarias mediadas por células. La primera evidencia de una respuesta inmunitaria mediada por células en GPT fue la demostración de la producción específica de antígeno, en lechones infectados, del factor inhibidor de la migración de los macrófagos (Frederik y Bohl, 1976). Posteriormente, se encontraron en cerdos infectados linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígeno, así como Th (Bullido y col., 1989). Probablemente, por tanto, la protección es complejo fenómeno multifactorial, que incluye a la IgA, donde hay que tener muy en cuenta la inducción de una respuesta inmunitaria celular significativa.

3.2.2. Vacunación

Ya que no existen tratamientos eficaces, la progresión de la enfermedad únicamente puede limitarse por medio de una profilaxis vacunal. Esto ha llevado a muchos laboratorios a hacer esfuerzos para el desarrollo de vacunas y/o estrategias para su administración. Como se ha visto las IgA específicas anti-VGPT están presentes en la leche de las cerdas únicamente tras una infección intestinal previa. Por el contrario, tras la inmunización parenteral se pueden obtener altos títulos de IgG en leche, pero no de IgA (Bohl, 1972). Por esta razón los esfuerzos para el desarrollo de vacunas plenamente satisfactorias frente a la VGPT no se han visto coronados por el éxito (Moxley y Olson, 1989). La vacunación oral de las madres con cepas atenuadas (vacunas atenuadas frente a la GPT) tampoco resuelve el problema, ya que tienen tan

solo una limitada eficacia. Por su limitada capacidad de replicación en el intestino, estas cepas no inducen una producción de IgA significativamente alta.

Dado que la exposición a virus virulento conlleva riesgos (posibilidad de perpetuar la enfermedad o introducirla en granjas no infectadas), la búsqueda de una vacuna se ha centrado en el uso de coronavirus relacionados, virus atenuados y cepas variantes del VGPT, así como en vacunas de subunidades como inmunógenos. No obstante, también existen problemas asociados al uso de virus vivo atenuado ya que, bajo ciertas condiciones, pueden revertir a virulentos y esto puede resultar en un brote.

3.2.2.1. Virus atenuados

Existen vacunas comerciales disponibles en el mercado consistentes en virus atenuados que se administran oral e intramuscularmente para incrementar su eficacia. Sin embargo, el grado de protección que se consigue ha sido decepcionante, probablemente debido al bajo nivel de infección del intestino que es inadecuado para estimular una respuesta inmunitaria protectora. Además, la inconveniencia de multidosis y multirutas es otra desventaja que presentan estas vacunas.

3.2.2.2. Cepas variantes

Woods (1978) desarrolló una cepa de VGPT que tiene tropismo por las células de las criptas del ID en vez de las células epiteliales de las vellosidades. Consecuentemente, no se produce una atrofia de las vellosidades en la infección y no se observan signos clínicos de GPT. Se ha propuesto, por ello, como base para una vacuna. Sin embargo, las células de las criptas maduran en células absortivas del epitelio vellosa, y, por tanto, no parece aconsejable la introducción de este nuevo virus en cerdos.

Shirai y col. (1988) (Aynaud y col., 1986) han desarrollado otra cepa, cepa Nouzilly, resistente a pH ácido y enzimas digestivas, que ha demostrado ser

inmunogénica en la cerda gestante tras inmunización oral. Puesto que no se encuentra ninguna relación entre el título de las distintas clases de Ig y el nivel de protección no se conocen cuales son los factores responsables de la protección pasiva lactogénica ya que la IgA no parece ser el único parámetro implicado (Bernard y col., 1990).

3.2.2.3. Vacunas de subunidades

Para muchos sistemas víricos se ha dirigido la atención hacia el desarrollo de subunidades como agentes inmunizantes. Estos inmunógenos por subunidades pueden ser producidos, bien por fraccionamiento de los viriones, bien por interrupción de la secuencia de replicación vírica en algún punto en el que ya se han sintetizado los antígenos esenciales pero anterior al ensamblaje de viriones intactos o virulentos. Las subunidades utilizadas como antígenos ofrecen la ventaja de ser completamente seguras porque el ácido nucleico esencial para la replicación del virus puede ser eliminado, pueden eliminarse factores tóxicos y pueden seleccionarse componentes para inducir una especificidad más limitada.

Gough y col. (1983) han descrito un inmunógeno de pequeño tamaño, probablemente un componente de la superficie asociado al peplómero (asociado con la unión del virus a las células), que, inyectado vía IM, induce actividad neutralizante y parece efectiva en la protección de cerdos de cebo así como en la inducción de una buena inmunidad lactogénica (mortalidad del 4% comparada con el 73% de los testigos), aunque no se ha determinado la clase de Ig. Se especula que la reacción inmunitaria dirigida frente a este componente proporciona protección al prevenir la iniciación de la infección en las vellosidades intestinales. La explicación de porqué esta subunidad del virus induce una buena inmunidad mientras que el virión intacto no lo hace pudiera estar en que el procesamiento del antígeno se realizara en sitios diferentes según fuera soluble o no.

Paul y col. (1986) tras digestión enzimática del VGPT encuentran que una subunidad de 23 kDa es inmunogénica y eficaz en la prevención de GPT en lechones que maman de cerdas vacunadas.

También se han inyectado vía IMM preparaciones de peplómeros del virión y se ha demostrado la presencia de Acs neutralizantes en el suero y calostro de las hembras inyectadas (Garwes y col., 1979).

4. PROTECCION CRUZADA. EL CVRP EN LA PROFILAXIS DE LA GPT.

Hasta el momento los coronavirus aislados de mamíferos y aves se han agrupado en 4 clases antigénicas entre las que se ha demostrado poca o ninguna reactividad cruzada.

La relación antigénica entre distintos coronavirus ha sido estudiada por métodos moleculares e inmunológicos. Basándose en resultados serológicos, los coronavirus de mamíferos se dividen en dos serotipos:

- Coronavirus humano 229E, coronavirus canino, virus de la peritonitis infecciosa felina, coronavirus entérico felino, coronavirus respiratorio porcino y virus de la gastroenteritis porcina transmisible (Sánchez y col., 1990; Hohdatsu y col., 1991).
- Coronavirus humano OC43, coronavirus de la rata, coronavirus bovino, virus de la encefalomiелitis hemaglutinante, y virus de la hepatitis murina.

Aunque todos los virus dentro de cada serotipo son antigénicamente similares, muestran poca similitud con virus del otro serotipo.

Se ha demostrado una relación antigénica estrecha entre VGPT y CVC por IFI, SN cruzada (Woods y Wesley, 1986), por la similitud de los PM de sus proteínas y por ensayos de ELISA e IB (Laviada y col., 1991).

Así mismo, la relación antigénica entre VGPT y VPIF es especialmente fuerte (Reynolds y col., 1977). Sin embargo, la infección con VGPT no protege a los gatos frente a una infección con VPIF, mientras que en cerdos se ha descrito una moderada inmunidad frente al VGPT cuando son inoculados y sufren una infección por VPIF (Woods y Pedersen, 1979).

El CVRP induce la producción de Acs neutralizantes del VGPT en el suero y la leche de los animales infectados. Desde su aparición el CVRP se ha hecho enzoótico en la población porcina europea de modo que la mayoría de las cerdas poseen Acs neutralizantes del VGPT, inducidos por CVRP, en suero y leche. Este hecho puede tener importancia en la protección de los animales frente a la GPT, y en el comportamiento epidemiológico de esta enfermedad, dada su enorme difusión.

Los estudios realizados sobre la protección cruzada CVRP-VGPT han tenido resultados variables y en ocasiones contradictorios:

- Los estudios de Hooybergs y col. (1988) de tres brotes de GPT en tres granjas que previamente habían sufrido infección por CVRP parecen indicar que el CVRP estimula el sistema inmune, pero no lo suficiente como para inducir protección, aunque facilitaría la rápida aparición de una respuesta secundaria tras la infección con el VGPT.
- Van Nieuwstadt y col. (1989) no obtuvieron ningún tipo de protección cruzada en lechones inoculados con VGPT virulento un mes después de haber sido expuestos a CVRP por vía intranasal.

- Por otro lado, Pensaert y Cox (1989) afirman que la inoculación intrainestinal, y no la inoculación intranasal, con CVRP induce inmunidad local, disminuyendo la gravedad de una exposición posterior a VGPT.
- Bernard y col. (1989) inocularon VGPT virulento a los lechones de cerdas infectadas naturalmente con CVRP, que presentaban anticuerpos neutralizantes anti-VGPT en suero y leche. Mientras que la mortalidad de los testigos fue del 91%, en los lechones nacidos de las madres infectadas con CVRP esta descendió hasta el 44%. Estos autores obtuvieron tasas de mortalidad similares en lechones nacidos de madres vacunadas con VGPT (40%), lo que indicaba que la infección por CVRP induce una protección semejante a la del virus homólogo.
- Por el contrario, Paton y Brown (1990) en un experimento similar llegaron a la conclusión contraria cuando los lechones de cerdas inoculadas con CVRP presentaron signos clínicos y tasas de mortalidad similares a los lechones testigo, nacidos de madres no inoculadas. La gravedad de la diarrea y las tasas de mortalidad fueron menores en los lechones de cerdas inoculadas con VGPT, a pesar de que los títulos de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero y la leche de ambos grupos de cerdas fueron muy similares.

Las cerdas inmunes con CVRP, parece bien establecido, no protegen a sus lechones frente a una infección intestinal con VGPT a pesar de que sí se demuestra una correlación positiva entre el título de IgA específica anti-VGPT inducida por CVRP y la supervivencia de los lechones. Callebaut y col. (1990) estudiaron la secreción de IgA neutralizantes del virus de la GPT en cerdas infectadas naturalmente con el CVRP. Sólo el 32% de estas cerdas produjeron IgA, mientras que se detectaron en el 100% de las cerdas que habían superado una infección por el VGPT. Las reinfecciones por el CVRP aumentaron el porcentaje de cerdas productoras de IgA hasta el 84%. Estos autores, por tanto, han sugerido que la ocurrencia de reinfecciones por CVRP puede determinar la prevalencia de IgA lactogénica, ya que se produce un descenso

significativo en los títulos de IgA específica anti-VGPT 24 semanas post-inoculación (Van Deun y col., 1990). Estas reinfecciones parecen ser bastante frecuentes durante la lactación. Por lo tanto, las reinfecciones periódicas en el campo son probablemente responsables de la observación de que la mayoría de las cerdas posean IgA anti-VGPT lactogénica.

El mecanismo inmunológico por el que las cerdas infectadas con CVRP segregan IgA en la leche no parece probable que consista en la migración de linfocitos estimulados en el intestino, ya que la capacidad de replicación intestinal de este virus es muy pequeña. Van Deun y col. (1990) proponen que la infección por el CVRP estimularía los linfocitos del BALT que migrarían después a la mama. Además, resultados recientes obtenidos por Cox y col. (1992) parecen indicar que la inoculación vía aerosol del CVRP estimula tanto el sistema inmune sistémico como el sistema inmune intestinal. Estos datos parecen indicar la existencia, para la infección respiratoria con CVRP, de un **vínculo inmunológico mucosa respiratoria - mama**, al igual que existe en el intestino.

El CVRP, por tanto, puede tener importancia en la protección de los animales frente a la GPT, y en el comportamiento epidemiológico de esta enfermedad. Es posible que la inmunidad lactogénica que, al menos en parte, confiere el CVRP, haya influido en la disminución de brotes clínicos de GPT en Europa. Ello no impide que, al no haber una protección total, puedan darse brotes de GPT en granjas previamente infectadas con CVRP (Hooybergs y col., 1988). Pensaert y Cox (1989) afirman que, coincidiendo con la aparición del CVRP, los brotes masivos de diarreas neonatales por el VGPT se han hecho raros en Bélgica. Bernard y col. (1989) atribuyen esta disminución a la protección cruzada entre CVRP y VGPT. Van Deun y col. (1990) creen que es probable que la presencia de estos Acs lactogénicos de clase IgA inducidos por CVRP en la leche de las cerdas resulte en una disminución en la intensidad de los brotes de GPT, que pasarían desapercibidos.

Paton y Brown (1990) no comparten esta opinión ya que la GPT ha fluctuado mucho en el pasado y el presente descenso en brotes de la enfermedad no tiene porque asociarse necesariamente a la aparición del CVRP.

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Los procesos gastrointestinales suponen una de las principales causas de mortandad neonatal en el cerdo. Uno de los agentes patógenos con más incidencia mundial es el VGPT. Este virus constituye uno de los riesgos potenciales más importantes, desde el punto de vista de la sanidad animal, al ser fácilmente introdurible por los animales de importación traídos de países de la Comunidad Europea, donde la enfermedad está muy extendida. En España la enfermedad ha sido diagnosticada en diversas ocasiones pero la difusión ha sido bastante limitada. La última ocasión en que se diagnosticó un brote de GPT en España (provincia de Madrid) fue en 1988, por nuestro laboratorio. En este caso se pudo demostrar que la infección había sido introducida en la explotación por lechones importados de Bélgica.

A pesar de la menor incidencia en España, el estudio del VGPT resulta de un enorme interés ya que constituye un modelo muy útil para el estudio de la generación de la respuesta inmunitaria en mucosas. El tracto gastrointestinal, y en general, las superficies cubiertas por mucosas, constituyen las áreas orgánicas que mantienen un contacto más estrecho con el sistema inmune y los múltiples antígenos extraños que están continuamente presentes en el medio exterior. Estas superficies son la principal vía de entrada de muchos patógenos, además del VGPT, por lo que resulta de vital importancia el conocimiento en profundidad de los mecanismos de defensa en los que está implicado el sistema inmune de las mucosas, independiente, aunque relacionado con el sistémico, así como encontrar vías de presentación de antígenos que estimulen adecuadamente una respuesta protectora en este sistema inmune, altamente especializado, de modo que se puedan desarrollar vacunas eficaces y seguras para este tipo de agentes infecciosos.

El VGPT infecta a cerdos de todas las edades pero causa una alta mortalidad en cerdos menores de dos semanas de edad. El interés en protección frente a esta enfermedad se centra principalmente en proporcionar inmunidad pasiva o lactogénica a los lechones. En la protección pasiva frente al VGPT pueden estar jugando un papel importante factores tanto cuantitativos como cualitativos.

Los factores cuantitativos se refieren a la cantidad relativa de anticuerpos dirigidos frente a epítomos críticos en la neutralización del virus. Los cualitativos tienen que ver con la clase de inmunoglobulina generada por cada sitio antigénico, especialmente la IgA, demostrada como la de mayor valor protector por su estabilidad frente a las condiciones gastrointestinales así como su afinidad por las mucosas.

A la pregunta de cómo generar una respuesta inmunitaria protectora que aúne tanto los aspectos cualitativos como cuantitativos necesarios para proteger pasivamente a los lechones lactantes, han respondido diversos trabajos científicos en el sentido de que parece posible generarla únicamente a través de inoculaciones orales de virus virulentos de la GPT a cerdas gestantes. Sin embargo, en trabajos recientes con la variante de tropismo respiratorio se han obtenido resultados prometedores en cuanto a protección cruzada, que aconsejan un estudio en profundidad de la generación de la respuesta inmunitaria comparada entre ambos virus. Uno, el productor de la GPT, posee tropismo intestinal y, por tanto, genera una respuesta inmunitaria local en esta superficie mucosa (GALT), la cual se ha demostrado relacionada con la glándula mamaria. El CVRP, con tropismo respiratorio, estimula el sistema inmune asociado a bronquios (BALT) y, dado que también es capaz de inducir la secreción de IgA en leche, parece relacionado igualmente con la glándula mamaria. No obstante, la eficacia de ambos virus para inducir protección lactogénica a los lechones lactantes es diferente a pesar de que los títulos de anticuerpos secretores neutralizantes *in vitro* son muy similares.

El estudio de las diferencias entre ambas generaciones de respuesta inmunitaria, como consecuencia de la estimulación en diferentes compartimentos del sistema inmune

de las mucosas (BALT o GALT), es de gran interés general, a la vez que es indicativo de lo realmente importante en protección frente al VGPT. En espera del desarrollo de vectores eficaces y seguros de presentación antigénica en superficies mucosas, es de gran interés la definición de los epítomos víricos relevantes en la protección mediada por anticuerpos en esta enfermedad, con el fin de avanzar en el conocimiento que permita, en un futuro, desarrollar una vacuna exenta de riesgos por ingeniería genética.

Los objetivos concretos más importantes que se han abordado en la presente tesis son los siguientes:

- 1.- Identificación de los epítomos víricos inmunodominantes durante la infección con un virus virulento capaz de inducir protección lactogénica en cerdas gestantes.
- 2.- Identificación de los epítomos víricos mediadores de la neutralización del virus que induzcan preferencialmente IgA secretora tras la inmunización de cerdas gestantes.
- 3.- Análisis comparativo de la generación de anticuerpos secretores en glándula mamaria tras la estimulación en BALT o GALT y su relación con el grado de protección pasiva conferida tras ambos tipos de presentación antigénica.
- 4.- Determinación de los epítomos víricos relevantes en protección *in vivo* mediada por anticuerpos.

MATERIALES Y METODOS

1. VIRUS

Las cepas de VGPT que se han empleado en este trabajo se indican a continuación:

- PUR 46** Aislada en 1946 en la Universidad de Purdue (EE.UU.) y pasada 120 veces en células ST. Atenuada. (Bohl, 1972; Bohl y Kumagi, 1965; Bullido y col., 1989).
- MAD 88** Aislada en España en 1988, en una granja en la que se habían recibido cerdos procedentes de Bélgica, y pasada 7 veces en células ST. Virulenta. (Laviada y col., 1988; Laviada, 1991).

La cepa de CVRP empleada:

- BEL 85-83** Aislada en Bélgica en 1986, y pasada 7 veces en células ST. (Pensaert y col., 1986; Callebaut y col., 1988; Sánchez y col., 1990, De Diego y col., 1992). Recibida del Dr. L. Enjuanes (CBM CSIC-Universidad Autónoma de Madrid).

2. LINEAS CELULARES

Para el cultivo de todas las cepas de VGPT y CVRP se empleó la línea celular ST, de testículo de cerdo. Para el mantenimiento de esta línea se empleó medio mínimo esencial de Eagle con la modificación Dulbecco (DMEM) (Dulbecco y Freeman, 1959), preparado según la formulación Gibco (cat. n° H21), al que se añadieron: aminoácidos no esenciales 10 ml/l, piruvato sódico 0,11 g/l, bicarbonato sódico 3,7 g/l, gentamicina 80 g/ml, y el antimicótico ácido p-hidroxibenzoico n-butil ester 0,2 ppm (Sigma). El medio fue suplementado con el 10% de suero fetal bovino (SFB) (Flow).

3. PRODUCCION DE VIRUS EN CULTIVOS CELULARES

3.1. OBTENCION DE INOCULO VIRICO

Para la obtención de inóculo, se infectó una monocapa de células ST confluentes con virus a una multiplicidad de infección (mi) entre 0,1-1. Después de un periodo de adsorción de 2 horas a 37°C, se añadió medio DMEM suplementado con un 5% de SFB y se incubó hasta que el efecto citopático (ecp) fue del 20% aproximadamente (18-20 hpi), lo que correspondió con el momento en que la infectividad vírica fue máxima. Se recogió el sobrenadante de cultivo conteniendo el virus extracelular, y, después de centrifugar a 2.000 rpm durante 10 minutos para sedimentar restos celulares, se añadió hasta un 20% de SFB y se almacenó a -80°C.

3.2. SEMIPURIFICACION DE VIRUS

La semipurificación de virus se llevo a cabo a partir del sobrenadante de cultivos infectados con una mi de 1-10 y recogidos con un ecp del 80-90%. Después de una centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos para eliminar restos celulares, el virus se sedimentó por ultracentrifugación a 100.000 x g durante 1 hora. El virus sedimentado fue resuspendido en tampón TNE (Tris-HCl 0,01 M pH 7,5; NaCl 0,1 M;

EDTA 1 mM) y guardado a -80°C hasta su empleo. La cuantificación y determinación de su pureza se realizaron por electroforesis SDS-PAGE.

3.3. PURIFICACION DE VIRUS

La purificación del virus se llevo a cabo partiendo de virus sedimentado como se describe en el capítulo anterior. Después de resuspender el sedimento en tampón TNE se centrifugó a través de un gradiente continuo de sacarosa 20-60% (P/P) en TNE durante 4 horas a $90.000 \times g$. La banda que contenía el virus purificado, correspondiente a una densidad de sacarosa de $1,18-1,20 \text{ g/cm}^3$, se recogió, se diluyó en TNE para eliminar la sacarosa y se concentró por sedimentación a $100.000 \times g$ durante 1 hora. El virus purificado se guardó a -80°C en TNE hasta su utilización (Brian y col., 1980). Su cuantificación se realizó por determinación de cantidad de proteína, la valoración de su pureza por electroforesis SDS-PAGE y su título se determinó antigénicamente con suero hiperinmune.

3.4. TITULACION DE VIRUS

3.4.1. Titulación de inóculo vírico

3.4.1.1. Estimación de la dosis infectiva 50 en cultivo celular (DICC_{50})

La DICC_{50} se estimó haciendo diluciones decimales en placas de cultivo de 96 pocillos, según el método de Reed y Muench (1938).

3.4.1.2. Estimación de las unidades formadoras de placa (PFU)

La determinación del título por (PFU)/ml se llevó a cabo según se describió anteriormente (Jiménez y col., 1986). Brevemente, diluciones decimales del inóculo

vírico fueron inoculadas a células ST confluentes crecidas en placas de 24 pocillos. Tras 1 h de adsorción, el inóculo fue reemplazado por medio que contiene 2% SFB y 0,7% de agarosa. Las células se incubaron a 37°C durante 2-3 días tras los que fueron fijadas con formaldehído 10% y teñidas con cristal violeta 0,1% para el conteo de las placas.

3.4.2. Titulación de virus purificado para ELISA

Se tapizan dos columnas de una placa ELISA (Dynatech) con diluciones por doblaje de virus purificado, comenzando con la dilución 1/100, y se hacen reaccionar con suero hiperinmune y suero negativo (ver apartado 8.3.1.).

Se considera la dilución óptima la dilución inmediatamente anterior al punto de inflexión de la curva de titulación.

4. VACUNACIONES Y CONTRAPRUEBAS

Seis cerdas gestantes de la raza Large White, de aproximadamente 100 kg de peso cada una, fueron inoculadas por vía oral con $2,5 \times 10^9$ DICC₅₀ de VGPT MAD 88 por dosis. Se administraron dos dosis por cerda, en los días 83 y 104 de gestación.

Dos cerdas gestantes de las mismas características fueron inoculadas mediante aerosol por vía oronasal con las mismas DICC₅₀ de CVRP BEL 85-83 por dosis, en los días 83 y 104 de gestación.

Una cerda gestante de las mismas características se mantuvo como control negativo, sin inocular.

Los lechones nacidos de la cerda control, de tres cerdas inoculadas con el VGPT y de las dos cerdas inoculadas con el CVRP fueron aislados, mantenidos en ayunas e

inoculados, por vía oral, con 10^8 DICC₅₀ de VGPT MAD 88, cuando contaban 7 días de edad. Al cabo de una hora, fueron devueltos a sus madres.

Una cerda más de las mismas características fue inoculada con VGPT virulento de igual forma que el primer grupo de cerdas. Los lechones nacidos de esta cerda fueron aislados en el primer día tras el parto de modo que únicamente tomaron calostro de la madre. A partir de su aislamiento los lechones fueron alimentados con leche de vaca tratada con gentamicina a una concentración final de 40 µg/ml y mantenida a 4°C, al menos toda la noche antes de su uso. Cuando contaban 7 días de edad los lechones fueron contraprobados como se ha descrito.

5. ANTICUERPOS

5.1. ANTICUERPOS MONOCLONALES

5.1.1. AcMs específicos del VGPT

Los AcMs, específicos del VGPT (obtenidos frente a la cepa Purdue), utilizados para los RIA y ELISA de competición fueron cedidos por el Dr. L. Enjuanes (CBM CSIC-UAM). Se emplearon sobrenadantes del cultivo de los hibridomas, conservados a -80°C hasta su uso. Sus características más relevantes se recogen en la tabla I (Jiménez y col., 1986; Correa y col., 1988; Suñé y col., 1990; Sánchez y col., 1990; Gebauer y col., 1991).

TABLA I

AcM	Especificidad		Clase de Ig	Titulo por RIA	Titulo por neutralización
	Proteína	Sitio y subsitio			
1CC12	S	Aa	IgG ₂ a	10 ⁴	6,1
1DE7	S	Ab	IgG ₁	10 ⁴	6,0
6AC3	S	Ac	IgG ₁	10 ⁴	>8,7
8BE3	S	A	IgG ₁	ND	ND
1DB12	S	B	IgG ₁	10 ⁵	0,3
1DG3	S	D	IgG ₁	10 ⁴	0,6
8DH8	S	D	IgG ₁	ND	1,0
9DB4	M	NA	IgG ₁	ND	<0,3
3BB3	M	NA	IgG ₁	10 ⁵	<0,3
3BD3	M	NA	IgG ₁	10 ⁴	<0,3
3DE3	M	NA	IgG ₂ b	10 ⁵	<0,3
3DC10	N	NA	IgG ₁	10 ⁴	<0,3
3CD8	N	NA	IgG ₁	10 ⁴	<0,3
3CE4	N	NA	IgG ₁	10 ⁴	<0,3

A, B, C y D corresponden a diferentes sitios antigénicos de la glicoproteína S, determinados previamente por RIA de competición. Aa, Ab y Ac son subsitios antigénicos del sitio A, determinados por caracterización de mutantes resistentes a la neutralización por AcM.

NA, no aplicable.

ND, no determinado.

Los títulos de los AcM se determinaron mediante RIA utilizando los sobrenadantes de los hibridomas.

El índice de neutralización se determinó dividiendo el número de PFU/ml de virus mezclado con medio normal por el número de PFU/ml de virus en presencia de un AcM y complemento, y se expresó como el log₁₀ del resultado.

5.1.2. AcMs específicos de clase de Ig porcina

Los anticuerpos monoclonales (hibridomas) empleados para la purificación, a partir de leche, de las clases de Ig porcina IgA, IgG₁ e IgG₂ fueron gentilmente cedidos por el Dr. Stokes (Universidad de Bristol, Reino Unido). El AcM específico de la IgM porcina, 5C9, fue obtenido del ATCC (n° HB 8371). Las características más relevantes de estos AcM se recogen en la tabla II.

TABLA II

AcM	Especificidad (clase Ig porcina)	Clase de Ig
K61	IgA	IgG ₁
K139	IgG ₁	IgG ₁
K68	IgG ₂	IgG ₁
5C9	IgM	IgG ₁

5.1.2.1. Purificación de AcMs a partir de líquido ascítico

Para realizar esta purificación se emplearon cromatografías de afinidad con Proteína A-Sepharosa CL-4B (Pharmacia). La resina se hidrató en tampón PBS, se montó en una columna y se mantuvo a 4°C hasta su utilización. En cada ensayo, se pasaron 2 ml de líquido ascítico por la columna, previamente diluidos en un volumen igual de tampón glicina 1,5 M, ClNa 3 M pH 8,9. Una vez equilibrada la columna con este tampón, se aplicó la muestra, eluyéndose la fracción de proteínas no adsorbidas con este mismo tampón.

Las Igs adsorbidas a la matriz se eluyeron con una solución de ácido cítrico 0,1 M pH 3, recogién dose fracciones de 2 ml, de las cuales se determinó su absorbancia a 280 nm. Las fracciones que contenían Igs fueron dializadas frente a bicarbonato sódico 0,1 M pH 8,3, con o sin NaCl 0,5 M, según su utilización posterior.

5.1.2.2. Marcaje con biotina de AcMs

Los anticuerpos, una vez purificados y dializados frente a bicarbonato sódico 0,1 M pH 8,3, se ajustaron a una concentración de 1 mg/ml. Un ml de cada AcM se mezcló con 125 µl de una solución de éster de N-hidroxisuccinimida-biotina (Sigma), diluido en dimetilsulfóxido, a una concentración de 1mg/ml. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 4 h a temperatura ambiente y posteriormente se dializó frente a PBS pH 7,2.

5.2. ANTICUERPOS POLICLONALES

5.2.1. Sueros, calostros y leches inmunes

5.2.1.1. Obtención

Cada cerda fue sangrada antes de cada inmunización: días 84 (suero 1) y 104 de gestación (suero 2), para realizar un seguimiento de la evolución del título de anticuerpos. Así mismo, todas las cerdas fueron sangradas tras el parto (suero 3).

Se recogió calostro de cada cerda el día del parto y leche de los dos días siguientes a este, así como en el día de la contraprueba de los lechones. De la cerda cuyos lechones fueron aislados el primer día post-parto únicamente se recogieron muestras de calostro.

Los lechones fueron sangrados en el día de la contraprueba y en los días 7 y 15 a partir de este.

5.2.1.2. Tratamiento

Una vez extraída la sangre se mantuvo a 4°C durante varias horas tras las que se centrifugó a 1.500 x g durante 30 minutos para separar el suero. Este se almacenó a -80°C hasta su utilización.

El calostro y la leche fueron tratados según el método descrito por Abou-Youssef y Ristic (1972) que consiste en una centrifugación a 10.000 x g durante 3 horas para eliminar la grasa libre y la caseína, seguida de otra centrifugación a 100.000 x g durante otras 3 horas. Finalmente, las lipoproteínas del suero así obtenido son precipitadas con 0,02 ml de sulfato de dextrano 500 al 10% y 0,1 ml de Cl_2Ca 1 M por ml de suero. El precipitado resultante se elimina tras una última centrifugación a 1.500 x g durante 10 minutos.

5.2.2. Sueros de campo anti-CVRP

Procedentes de cerdos de cebo obtenidos en matadero en 1987 (Laviada, 1991), pertenecientes a varias granjas de ciclo cerrado de la provincia de Segovia y conservados a -80°C.

5.2.3. Clases de Ig purificadas

Se purificaron los distintas clases de Ig porcina: IgM, IgA, IgG₁ e IgG₂ a partir del calostro y la leche obtenida de 3 cerdas inoculadas con el VGPT, de 2 cerdas inoculadas con el CVRP y de la cerda control, por medio de cromatografía de afinidad con AcM específicos de los distintas clases de Ig porcinas.

Los AcMs específicos de las clases purificados se unieron covalentemente a bolas de sefarosa (Sephacrose CL-4B) (Pharmacia) en tampón NaHCO_3 0,1 M - NaCl 0,5 M pH 8,3, en una proporción de 5 mg de proteína por cada ml de gel. La mezcla se mantuvo en rotación durante 4 h a temperatura ambiente, pasadas las cuales, los

anticuerpos que no quedaron unidos a la sefarosa se eliminaron con varios lavados de PBS. Los sitios activos restantes fueron bloqueados con un tampón glicina 0,2 M, pH 8, durante 2 h. El gel fue montado en las columnas, lavado con PBS y a continuación incubado con una solución de dietilamina 0,05 M, pH 11. Finalmente, las columnas fueron equilibradas en PBS.

El calostro y la leche de las cerdas, 2-4 ml, se pasaron por las cuatro columnas diluidos en PBS, pasando dicho tampón por la columna hasta eliminar todas las proteínas no adsorbidas. Las Igs unidas a las columnas se eluyeron con una solución de dietilamina 50 mM pH 11. Se recogieron fracciones de 2 ml, que fueron inmediatamente neutralizadas con un tampón Tris-HCl 2 M pH 3. Las fracciones con mayor concentración de Ig fueron dializadas frente a PBS y mantenidas a 4°C hasta su uso.

La cuantificación de las fracciones de Igs purificadas se realizó por determinación de la absorbancia a 280 nm y la pureza determinada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, así como por medio de ELISA directo empleando los AcMs específicos de clase de Ig porcina (ver apartado 8.3.2.).

6. METODOS DE ANALISIS DE PROTEINAS

6.1. MARCAJE METABOLICO DE PROTEINAS CON METIONINA-

³⁵S

Para marcar radiativamente las proteínas sintetizadas durante la infección vírica, se infectaron células ST confluentes con virus a una m.i. de 1-5. Se dio un pulso de 2 horas con el isótopo radioactivo (14 - 16 hpi), procediéndose de la siguiente manera. Se retiró el medio y se lavó la monocapa con MEM sin metionina, añadiéndose a continuación medio MEM sin metionina con 1% de SFB y metionina-³⁵S a una concentración de 200 µCi (800 Ci/mmol; Amersham) por ml. Después de las 2 horas

de incubación, se retiró el medio de marcaje, se lavaron las células y se añadió el tampón de muestra de SDS-PAGE (Escribano y col., 1987; Alcaraz y col., 1988).

6.2. CONTAJE DE MUESTRAS RADIATIVAS

Para cuantificar la radiactividad específicamente incorporada a proteínas durante el marcaje metabólico (para RIPA, ver apartado 8.1), se añadió a 2 μ l de la muestra a analizar, 23 μ l de tampón de conteo (SFB al 25%, PBS pH 7,2 y ácido tricloracético al 0,4%). La mezcla se incubó en hielo durante 30 min y se pasó a través de un filtro de 0,45 μ m. Este se secó a 80°C y se introdujo en un tubo de conteo que contenía 2 ml de líquido de centelleo (5% PPO (Merck), 1% Dimetil-POPOP (Merck), 66,6% Tolueno, 33,3%).

Las muestras así preparadas en viales de centelleo, se introdujeron en un contador de radiaciones β para su lectura.

6.3. METODOS ELECTROFORETICOS

6.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-DATD en presencia de SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas se realizó en un gel discontinuo de acrilamida-DATD en presencia de SDS, siguiendo el método descrito por Tabarés y col. (1980). Para ello se preparó un gel separador de acrilamida al 17% y DATD al 0,046% y un gel apelmazador de acrilamida al 3,5 % y DATD al 0,09%.

Las muestras se solubilizaron en tampón de disociación de proteínas SR (Tris-HCl 58 mM pH 7, SDS 2,3%, 2-ME 2%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,002%), se calentaron 2 minutos a 100°C y se aplicaron al gel. La electroforesis se desarrolló a una intensidad constante de 18 mA.

6.3.2. Fluorografía y autorradiografía

Una vez realizada la electroforesis, en aquellos casos en que las muestras estaban marcadas con metionina-³⁵S, el gel se sometió a fluorografía según el método descrito por Bonner y Laskey (1974).

Finalmente, el gel se secó a vacío y se puso en contacto con una película radiográfica AGFA (CURIX RP2), a -80°C durante un tiempo proporcional a la radiactividad contenida en la muestra.

7. VALORACION DE PROTEINAS

Se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Lowry y col. (1951) con algunas modificaciones para la valoración de proteínas insolubles. Se incubó la muestra durante 30 minutos a 37°C en 0,1 ml de NaOH 1N, tras lo cual se añadió 0,1 ml de agua destilada. El resto del proceso se realizó como está descrito pero sin incluir NaOH en la solución alcalina de la primera reacción. Se utilizó como proteína estándar, γ -globulina bovina a una concentración inicial de 1,45 mg/ml (Bio Rad) diluida en la misma solución que la muestra.

8. METODOS SEROLOGICOS

8.1. RADIOINMUNOPRECIPITACION (RIPA) DE PROTEINAS ANTIGENICAS

Alícuotas de 10^6 cuentas por minuto (cpm) de extractos de células infectadas marcadas radiactivamente (ver apartados 6.1 y 6.2) y lisadas con un tampón que mantiene las proteínas en su estructura nativa (tampón VDB: Tris-ClH 50 mM pH 7,5, NP40 1%, EDTA(Na₂) 5 mM, deoxicolato sódico 0,5%, PMSF 1 mM) (Jiménez y col.,

1986) se inmunoprecipitaron con los sueros, calostros o leches correspondientes siguiendo el método descrito por Alcaraz y col., 1990). Brevemente, los extractos celulares marcados se incubaron durante 1 hora a 25°C con los Acs de las cerdas inmunizadas en un tampón formado por Tris-HCl 0,05 M pH 8, NP40 0,5%, EDTA 2 mM, ClNa 0,5% y SDS 0,2% y precipitados por una suspensión de *Staphilococcus aureus* al 20% en PBS (Calbiochem). Las bacterias con los inmunocomplejos adsorbidos se lavaron y se trataron con un tampón de elución (Tris-HCl 50 mM pH 7, SDS 2%, 2-ME 5%, glicerol 12,5%, azul de bromofenol 0,01%) a 60°C durante 5 min para separar los inmunocomplejos. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por electroforesis convencional.

8.2. DETECCION DE ANTICUERPOS ESPECIFICOS MEDIANTE LA TECNICA DE "IMMUNOBLOTTING" (IB)

250 µg de VGPT semipurificado se depositaron sobre un gel de acrilamida-DATD al 15% y se realizó una electroforesis para la separación de sus proteínas como se ha descrito anteriormente. A continuación fueron electrotransferidas a un filtro de nitrocelulosa (Bio-Rad) durante 4 horas a una intensidad constante de 1 mA/cm², siguiendo métodos ya descritos (Towbin y col., 1979; Pastor y col., 1990).

El filtro con las proteínas transferidas se cortó en tiras longitudinales que se incubaron con solución de bloqueo (PBS con leche desnatada al 2% y tween 20 al 0,05%) durante 1 h a 37°C. Se incubaron entonces con los sueros, calostros y leches a la dilución 1/30 en la misma solución. Tras tres lavados con este mismo tampón de dilución, se incubaron las tiras con proteína A conjugada con peroxidasa (Sigma) y se revelaron con el sustrato 4-cloro-naftol en presencia de H₂O₂ (Alcaraz y col., 1990).

8.3. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)

8.3.1. ELISA indirecto para la detección de anticuerpos.

Para este ensayo se tapizó la placa ELISA con virus purificado, VGPT o CVRP, diluido en tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6 a la concentración óptima, determinada por ensayo previo de titulación, lo que se correspondía con alrededor de 0,4 µg por pocillo, incubándose a 4°C durante 18 h. Se añadió solución de dilución (PBS con SFB 30% y tween 20 al 0,05%) para bloquear los sitios de unión inespecíficos y, tras lavarlas 3 veces con solución de lavado (H₂O con tween 20 al 0,05%), se incubaron con los sueros, calostros y leches, diluidos al 1/30 en solución de dilución o bien con diluciones dobles crecientes a partir de 1/2 en el mismo tampón cuando el propósito era la titulación de las muestras.

Después de 1 h de incubación a 37°C, se lavaron las placas y se añadió proteína A conjugada con peroxidasa (Sigma) a la dilución óptima en la misma solución anterior, incubándose a 37°C durante 1 hora. Se lavaron de nuevo las placas y se añadió sustrato DMAB-MBTH (Ácido 3-dimetilamino-benzoico, 3-metil-2-benzo-tiazolinonahidrazona). Se dejó reaccionar hasta la aparición de color, y se frenó añadiendo una solución de ácido sulfúrico 3N. Finalmente, las reacciones se leyeron espectrofotométricamente a una densidad óptica (O.D.) de 620 nm.

Los valores de O.D. superiores a 0,3 se consideraron positivos. En los ensayos de titulación, se consideró el título de anticuerpos al log₂ del recíproco de la máxima dilución que dio valor positivo.

8.3.2. ELISA para la determinación de la pureza de las clases de Ig purificadas.

Para este ensayo se tapizó la placa de ELISA con diluciones por doblaje de las Igs purificadas, comenzando por 2 µg/pocillo, por cuatriplicado. Tras bloquear se

añadieron los AcMs conjugados con biotina anti-IgA, anti-IgG₁, anti-IgG₂ y anti-IgM (ver apartado 5.1.2.2), a la dilución óptima previamente determinada por titulación. A continuación se añadió un conjugado de estreptavidina con peroxidasa (Amersham) y las placas se revelaron como en el apartado anterior.

8.4. ENSAYOS DE UNION COMPETITIVA AL VGPT

8.4.1. Radioinmunoensayo de competición (RIAc)

Se realizó como se describe en Correa y col. (1988), con modificaciones. Brevemente, se tapizaron placas de ELISA con 0,4 µg de VGPT purificado (PUR 46) por pocillo, en tampón carbonato/bicarbonato pH 9,6. Tras incubación a 4°C durante 18 horas los pocillos se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en PBS durante 2 horas a 37°C.

A continuación se añadieron las diluciones de los sueros, calostros o leches a competir, en tampón de dilución (PBS con 0,1% BSA), y un volumen igual del AcM correspondiente, *excepto en los pocillos de control positivo (sólo AcM), y de control negativo (sólo la dilución correspondiente de muestra competidora)*, ambos con un volumen igual de tampón de dilución. Tras una incubación de 2 horas a 37°C se añadió un conjugado de IgG anti-Ig de ratón marcado con ¹²⁵I (Amersham) en tampón de dilución (PBS con 0,1% BSA) que contenía un 5% de suero negativo de cerdo. *El conjugado radiactivo se añade a una dilución tal que correspondan 10⁵ cpm/pocillo, que es el número de cpm óptimo calculado por una titulación previa, eligiéndose la mayor dilución a la que los AcM unieran el máximo número de cpm.* La incubación se realizó a 37°C durante 1 hora tras la que se lavaron las placas 6 veces para eliminar la radiactividad no fijada. Finalmente, se añadió solución de rotura SR (ver apartado 6.3.1.) y se recogió el contenido de cada pocillo en un tubo que fue leído en un contador de radiaciones γ.

El resultado obtenido en la competición de cada muestra con cada AcM se expresó en **porcentaje de competición**, definido por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de competición} = 100 - \% \text{ de unión}$$

siendo el **porcentaje de unión** el porcentaje de cpm unidas cuando se compitió la unión del AcM con una determinada muestra en relación con el número de cpm unidas en ausencia del anticuerpo competidor.

Cada ensayo se realizó al menos 3 veces considerándose como resultado final la media aritmética de los distintos valores obtenidos.

8.4.2. ELISA de competición (ELISAc)

Para este ensayo se tapizaron las placas como se ha descrito en el apartado anterior y se bloquearon de igual forma. A continuación se añadieron las muestras a competir (clases de Ig purificados) a las diluciones correspondientes en tampón de dilución (PBS con 0,1% BSA) excepto los pocillos de control positivo (sólo AcM) que se dejaron con tampón de dilución. Se incubaron durante 18 h a 4°C y posteriormente se añadieron los AcMs correspondientes (sobrenadantes de cultivo de los hibridomas) diluidos a 1/2 en el mismo tampón, excepto en los pocillos de control negativo (sólo Ig purificada) que se dejaron con tampón de dilución.

Tras una incubación de 1 hora a 37°C se añadió un conjugado de IgG anti-ratón marcado con biotina (Amersham), a la dilución óptima predeterminada por titulación, en tampón de dilución (PBS con 0,1% BSA) que contenía un 5% de suero negativo de cerdo para eliminar los fondos inespecíficos ocasionados por la reacción inespecífica de la IgG anti-ratón con las Igs porcinas. Finalmente, se reveló con un conjugado pretitulado de estreptavidina-peroxidasa (Amersham) siguiendo el procedimiento descrito en apartados anteriores.

Para los ensayos realizados en un solo paso, se incubaron a la vez el anticuerpo competidor y el AcM correspondiente durante 2 horas a 37°C y se procedió a continuación de la misma forma.

El resultado obtenido en la competición de cada muestra con cada AcM se expresó con la misma fórmula que para el RIAC, siendo en este caso el porcentaje de unión el porcentaje de O.D. obtenida cuando se compete la unión del AcM en relación con el valor de O.D. obtenido en ausencia de competidor.

Cada ensayo se realizó al menos 3 veces considerándose como resultado final la media aritmética de los distintos valores obtenidos.

8.5. SERONEUTRALIZACION

8.5.1. Determinación del título de SN en DICC₅₀

Los ensayos de SN se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos, determinándose la dilución límite capaz de neutralizar el 100% del ecp de las DICC₅₀ de VGPT correspondientes en cada ensayo, según la metodología descrita por Hsiung y Fong (1982). Se consideró el título de SN al log₂ del recíproco de la dilución límite.

8.5.2. Ensayos de reducción del número de placas.

La neutralización basada en la reducción del número de placas se llevó a cabo según se describió anteriormente (Jiménez y col., 1986). Brevemente, el número correspondiente de PFU en cada ensayo fue incubado durante 1 h a 37°C con una cantidad fija de anticuerpos o diluciones de estos en el caso de ensayos de determinación del título de SN. La mezcla fue inoculada a células ST confluentes crecidas en placas de 24 pocillos. A continuación se procede como se describió en el apartado 3.4.1.2.

8.5.3. Determinación de la cinética de neutralización

Para la determinación de la cinética de neutralización 50 µg de las clases purificadas, diluidos en DMEM, fueron incubados con 10^2 PFU de VGPT PUR46, e inoculados sobre monocapas de células ST crecidas en placas de 24 pocillos en los tiempos indicados: 1, 2, 3, 5, 10 y 30 min. El número de PFU y los porcentajes de neutralización fueron determinados como ya se ha descrito anteriormente.

8.5.4. Determinación de la reversibilidad de la neutralización

La reversibilidad de la neutralización del VGPT por las clases purificadas se estudió por dilución de los complejos virus-anticuerpo para posibilitar su disociación. Para ello, 100 µg de los anticuerpos fueron incubados con 10^3 PFU de VGPT PUR46 durante 1 h a 37°C hasta que el 100% del virus estaba neutralizado, como se demostró por la ausencia de placas de lisis tras el plaqueo sobre células ST. Finalmente, una dilución 1/100 de los complejos virus-anticuerpos así obtenidos fue inoculada sobre células ST y el número de PFU determinado.

9. ENSAYOS DE PROTECCION *IN VIVO*

La inoculación de lechones para los ensayos de protección se llevó a cabo basicamente como se ha descrito previamente (Wesley y col., 1988). Se emplearon lechones de 3-5 días de edad, nacidos de cerdas seronegativas a VGPT, alimentados con leche de vaca tratada con gentamicina a una concentración final de 40 µg/ml y mantenida a 4°C, al menos toda la noche antes de su uso. La ración diaria de leche fue dividida en 2 tomas de 25 ml y una de 60 ml durante los primeros 2 días y gradualmente incrementada a 60 ml por toma.

El AcM apropiado fue suplementado a la leche, a una dilución 1/100, en la tarde anterior a la contraprueba, para aquellos lechones que iban a ser continuamente alimentados con AcM. La dosis de virus a emplear, 10^3 DICC₅₀ de VGPT virulento MAD 88, diluida en DMEM a un volumen de 1 ml, fue incubada durante 1 h a 37°C con exceso de anticuerpo (0,6 ml de ascitis de AcMs específicos del VGPT o 250 µg de las clases de Ig purificadas) y administrada a los lechones por vía oral. Previamente se había establecido que dichas cantidades estaban en exceso de la cantidad mínima necesaria para neutralizar el 100% del ecp *in vitro* en estas condiciones, lo que fue corroborado al resultar negativa la titulación de las mezclas virus-anticuerpo sobre células ST. Los animales control recibieron la misma dosis de virus diluido a 1 ml en medio de cultivo e incubado 1 h a 37°C. Tras la contraprueba los lechones fueron aislados y mantenidos en ayunas durante 30 min. Para los lechones inoculados con AcMs las 2 primeras tomas del día, en los 3 primeros días de la experiencia, fueron suplementadas con líquido ascítico a una dilución 1/100. Los lechones fueron observados durante 1 semana, para la aparición de signos clínicos.

Los **porcentajes de protección** fueron calculados como el cociente entre el número de lechones que no presentaron signos clínicos y el número total de lechones en cada ensayo x 100. El número mínimo de lechones empleados para cada ensayo fue de 4.

RESULTADOS

1. ESPECIFICIDAD DE LA RESPUESTA INMUNITARIA PROTECTORA FRENTE AL VGPT

1.1. RESPUESTA INMUNITARIA CIRCULANTE Y SECRETORA FRENTE AL VGPT Y CVRP EN CERDAS GESTANTES

1.1.1. Vacunación de cerdas gestantes.

Seis cerdas seronegativas frente al VGPT (grupo I) fueron vacunadas por vía oral en los días 84 y 104 de la gestación con la cepa virulenta MAD88 de VGPT. Todas las cerdas de este grupo mostraron signos clínicos de la enfermedad, en mayor o menor grado, desde una ligera anorexia durante 1 o 2 días en las cerdas 6 y 7 a un cuadro más grave que incluía anorexia, diarrea y abatimiento, en cerdas 2 y 3, tras la primera inoculación.

Dos cerdas igualmente seronegativas (grupo II) se vacunaron en los mismos días de la gestación con CVRP BEL85-83 por vía oronasal. Las cerdas de este grupo no mostraron ningún signo clínico tras las inoculaciones.

Una cerda se dejó sin inocular, como control.

Por último, otra cerda de las mismas características fue vacunada con el virus virulento MAD88 y se empleó en una experiencia de contraprueba de sus lechones, a los que sólo se les permitió mamar calostro. Esta cerda mostró los mismos signos clínicos de anorexia y ligera diarrea que las pertenecientes al grupo I.

1.1.2. Título de anticuerpos

Todas las cerdas empleadas fueron sangradas tres veces para realizar un seguimiento de la evolución de la respuesta inmune humoral circulante frente a los virus inoculados. Los títulos de anticuerpos de los sueros fueron determinados por ELISA.

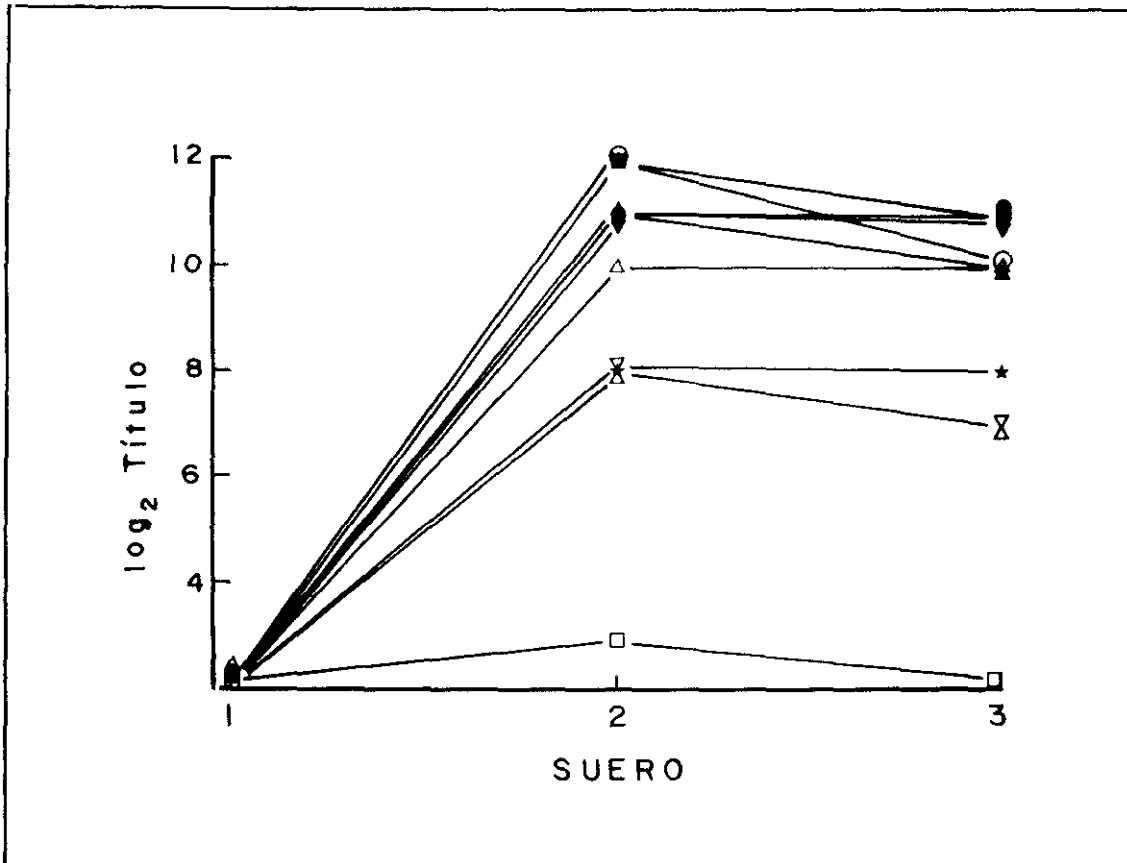


Figura 5.- Evolución del título de anticuerpos frente al VGPT de las cerdas 1 (□), no inmunizada, 2 (■), 3 (○), 4 (●), 5 (△), 6 (▲), 7 (◆), inmunizadas con VGPT virulento, y cerdas 8 (⌘) y 9 (★), inmunizadas con el CVRP.

En la figura 5 se representan los resultados obtenidos. Todas las cerdas pertenecientes a ambos grupos, desarrollaron anticuerpos circulantes específicos del VGPT tras la primera inoculación, cuyo título se mantuvo después de la segunda

inoculación. Entre ambos grupos de cerdas se observaron diferencias en cuanto al título de anticuerpos séricos. Las cerdas pertenecientes al grupo I, inoculadas con el virus de tropismo entérico, presentaron títulos similares entre si y superiores a los presentados por las cerdas inoculadas con el virus de tropismo pulmonar.

Tras el parto, se determinó también el título de los anticuerpos séricos (3ª sangría), así como de los anticuerpos secretores presentes en el calostro y la leche de todas la cerdas, tanto por ELISA como por SN, empleando VGPT purificado.

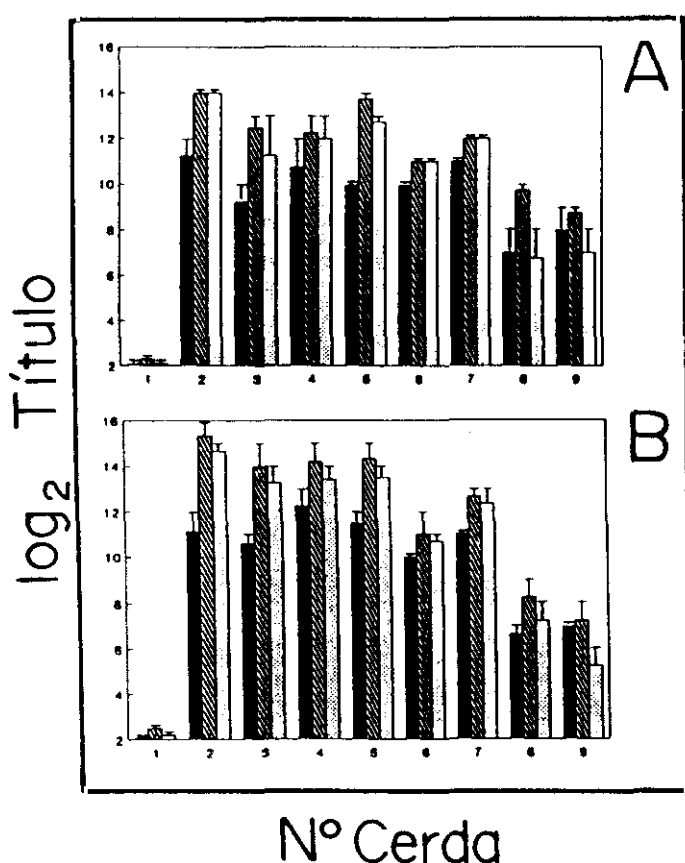


Figura 6.- Título de anticuerpos frente al VGPT de una cerda no inmunizada (1) y de cerdas inmunizadas con el VGPT (2-7) o CVRP (8 y 9), determinado por ELISA (A) o SN (B) en suero (■), calostro (▨) y leche (□). En la gráfica se muestra la desviación estándar de la media de tres determinaciones.

En la figura 6 se representan los títulos obtenidos por ambas técnicas. En los dos grupos de cerdas existió una buena correlación entre los títulos de anticuerpos totales (ELISA) y de anticuerpos neutralizantes (SN). Cuando los títulos de anticuerpos se determinaron por ELISA empleando CVRP purificado, los resultados fueron muy

similares a los obtenidos mediante el empleo de VGPT como antígeno. Así mismo, ambos virus se neutralizaron indistinguiblemente por los anticuerpos recogidos de los dos grupos de cerdas vacunadas.

Los títulos de anticuerpos en calostro y leche fueron superiores a los circulantes en las cerdas vacunadas con el virus entérico. Por el contrario, en las cerdas inoculadas con el virus respiratorio los títulos de anticuerpos secretores fueron similares a los de anticuerpos séricos. Los títulos de anticuerpos secretores, al igual de lo que ocurría con los circulantes, fueron mayores para las cerdas inoculadas con el VGPT, que para las inoculadas con el CVRP.

La respuesta de anticuerpos del el grupo II, inferior a la generada en el grupo I, se comparó con la respuesta producida en cerdas naturalmente infectadas con el CVRP. Una colección de sueros de campo de cerdos infectados naturalmente con CVRP se analizaron por ELISA, presentando títulos semejantes a los encontrados en las cerdas del grupo II (Fig. 7). Esto confirmó la menor eficiencia en la inducción de anticuerpos cuando la presentación antigénica, como consecuencia de la replicación del CVRP, se efectúa en el tejido linfoide asociado a mucosas del tracto respiratorio (BALT), en comparación con la que se produce por la presentación antigénica en el tejido linfoide asociado a mucosa intestinal (GALT), como consecuencia de la infección por VGPT.

Se determinó también el título de anticuerpos, por ELISA, del calostro de la cerda cuyos lechones fueron aislados el día posterior al nacimiento (Fig. 8). El calostro de esta cerda presentó un título de anticuerpos similar al del resto de las cerdas inoculadas con el VGPT.

La eficiencia de absorción de anticuerpos calostrales por los lechones lactantes pudo demostrarse mediante el análisis de los anticuerpos circulantes de estos lechones 7 días después del parto. Estos presentaron títulos de anticuerpos muy similares a los detectados en las cerdas madres en el momento del parto.

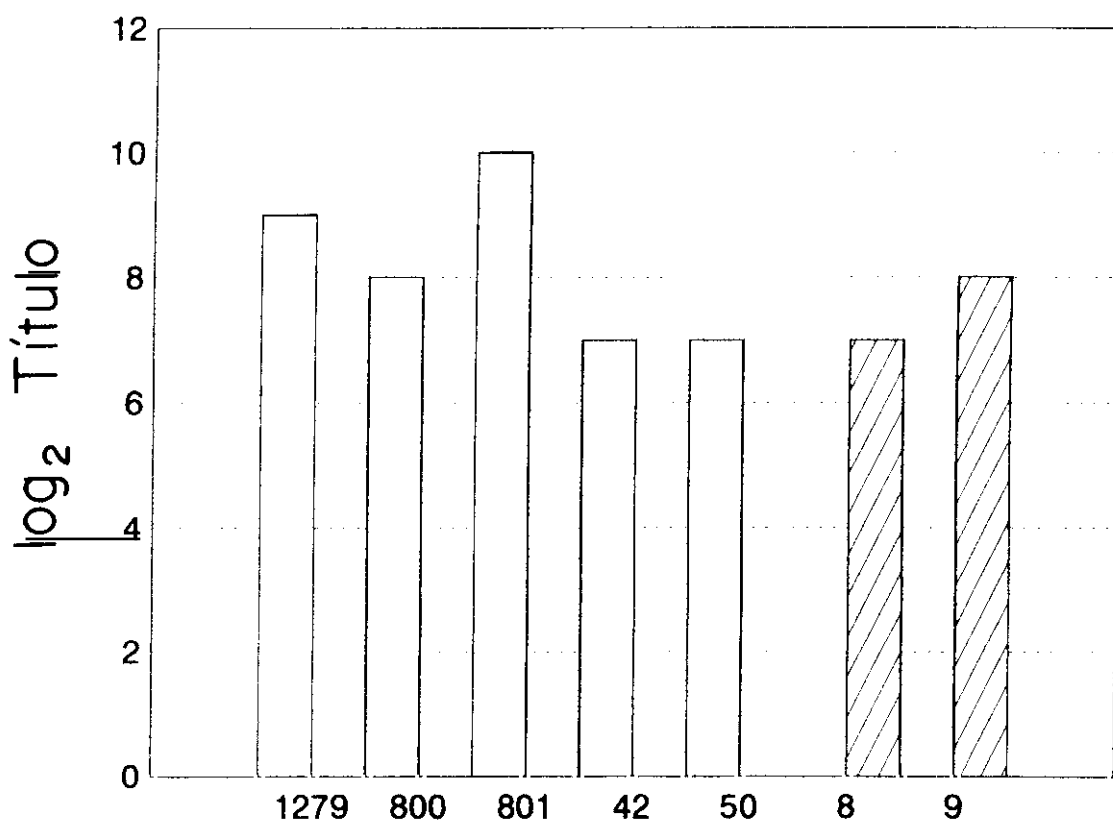
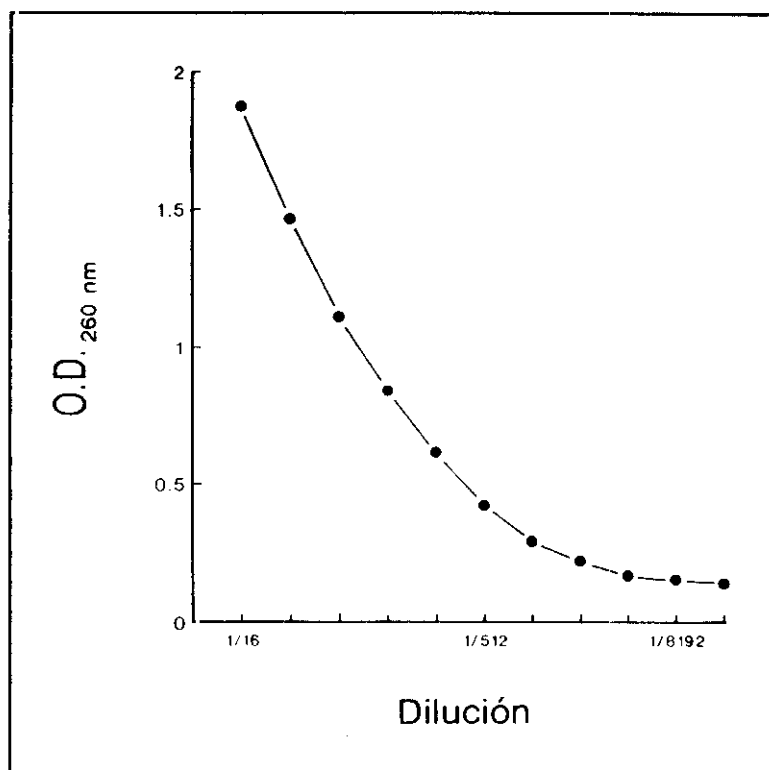


Figura 7.- Título de anticuerpos frente a VGPT de cinco sueros de campo y de los sueros, obtenidos el día del parto, de las cerdas 8 y 9, inmunizadas experimentalmente con CVRP.

Figura 8.- Título de anticuerpos frente al VGPT del calostro de una cerda, inmunizada con VGPT virulento, cuyos lechones fueron retirados el día después del parto.



1.1.3. Especificidad de la respuesta inmunitaria. Reconocimiento de proteínas

El estudio de la especificidad de los anticuerpos inducidos en ambos grupos de cerdas por los dos tipos de virus se estudió por las técnicas de IB y RIPA.

Todas las cerdas desarrollaron niveles detectables de anticuerpos frente a las tres proteínas estructurales mayoritarias del virus S, N y M, ya que fueron reconocidas, en ambas técnicas, por todas las muestras estudiadas (Fig. 9).

Las tres proteínas resultaron ser antigénicas, por tanto, en los dos grupos de cerdas, aunque se observaron diferencias con el empleo de una u otra técnica. Cuando el ensayo se realizó por IB, en condiciones parcialmente desnaturalizantes, la proteína N pareció ser la más antigénica, reaccionando más intensamente que las proteínas S y M. Por el contrario, estas últimas resultaron ser las mejor reconocidas por los anticuerpos, tanto secretores como circulantes, cuando se analizaron por RIPA. Estas diferencias pueden ser explicadas por la exposición conformacional de los epítomos en las distintas proteínas. Los epítomos presentes en las proteínas S y M parecen ser más dependientes de conformación que aquellos presentes en la proteína N.

En general, los anticuerpos circulantes del suero de las cerdas vacunadas con el VGPT, reaccionaron menos intensamente con las tres proteínas mayoritarias que los anticuerpos secretores, tanto de calostro como de leche. Esto concuerda con el mayor título de anticuerpos secretores, frente al de anticuerpos circulantes, que se ha descrito en el apartado anterior.

Los anticuerpos procedentes de las cerdas vacunadas con el CVRP, especialmente los de la cerda 9, reaccionaron con menor intensidad frente a las tres proteínas estructurales que los anticuerpos procedentes de las cerdas vacunadas con el virus entérico, no pudiéndose observar una diferencia clara en la reactividad de los anticuerpos circulantes y secretores.

Los lechones nacidos de las cerdas inoculadas con el CVRP desarrollaron también signos clínicos de la enfermedad entre las 24 y 48 horas posteriores a la contraprueba. Sin embargo, 5 lechones de la cerda número 8 y 2 de la cerda número 9 se recuperaron a los 3 o 4 días del inicio de los síntomas, lo que se traduce en unos porcentajes de protección de 62,5 y 28,5%, respectivamente.

TABLA III

Morbilidad y mortalidad de los lechones tras la contraprueba con VGPT virulento.

Cerde número	Virus ^a	Número de lechones			% Supervivencia
		Total nacidos	Con signos clínicos	Supervivientes tras contrapr.	
1	Ninguno	4	4	0	0
2	MAD-88	8	- ^c	-	-
3	MAD-88	10	- ^c	-	-
4	MAD-88	8	3 ^b	8	100
5	MAD-88	9	- ^c	-	-
6	MAD-88	5	5 ^b	5	100
7	MAD-88	5	5 ^b	4	80
8	BEL-85-83	8	8	5	62,5
9	BEL-85-83	7	7	2	28,5

^a Aislado de virus empleado para la vacunación de las cerdas.

^b Retraso en la aparición de signos clínicos, estos más leves, con respecto a los cerdos control.

^c No se realizó la contraprueba con el virus virulento.

Para la contraprueba de los lechones nacidos de cerdas inoculadas con el VGPT, se seleccionaron las camadas de tres de las cerdas vacunadas, representativas de alto, cerda 4, y bajo título de anticuerpos, cerdas 6 y 7. Los lechones nacidos de estas últimas presentaron una morbilidad del 100%, aunque la aparición de los primeros signos clínicos se retrasó 2 días con respecto al control, siendo estos mucho más leves, limitándose a una ligera diarrea de corta duración. Tan solo 1 lechón, nacido de la cerda 7, murió a los 6 días tras la contraprueba, lo que supone un porcentaje de protección del 80%. Por el contrario, la cerda 4 fue capaz de proteger de la infección a 5 de sus 8 lechones, mientras que los otros 3 presentaron también signos clínicos leves a los 3 o 4 días post-inoculación. En este caso la tasa de supervivencia fue del 100%.

Los 9 lechones que sólo recibieron calostro con alto título de anticuerpos específicos del VGPT, fueron igualmente contraprobados. El 100% de los lechones resultaron protegidos aunque la morbilidad fue también del 100%. Los signos clínicos sufrieron un leve retraso en su aparición con respecto al control y se limitaron a una diarrea de mayor o menor duración en los distintos lechones.

1.2. CARACTERIZACION DE EPITOPOS DEL VGPT Y CVRP INMUNODOMINANTES EN CERDAS INMUNIZADAS

Dado el grado de protección lactogénica cruzada encontrado entre el CVRP y el VGPT cabía esperar encontrar puntos en común entre las respuestas inmunitarias de ambos grupos de cerdas, principalmente en el reconocimiento de epítomos. Estos epítomos serían, por tanto, relevantes en la protección lactogénica. Con esta finalidad, se llevaron a cabo ensayos de RIAC, para determinar si los anticuerpos presentes en suero, calostro y leche de los dos grupos de cerdas inmunizadas eran capaces de bloquear la unión al virus de AcMs específicos de las tres proteínas estructurales mayoritarias.

1.2.1. Establecimiento de las condiciones para el RIAC

1.2.1.1. AcMs específicos de la proteína S

Se escogieron tres AcMs, cada uno específico de un subsitio del sitio A de la proteína S, y se llevaron a cabo ensayos de RIAC con distintas diluciones de anticuerpos circulantes (suero) y secretores (calostro y leche) de 2 cerdas, cada una representativa de un grupo de cerdas (Fig. 10).

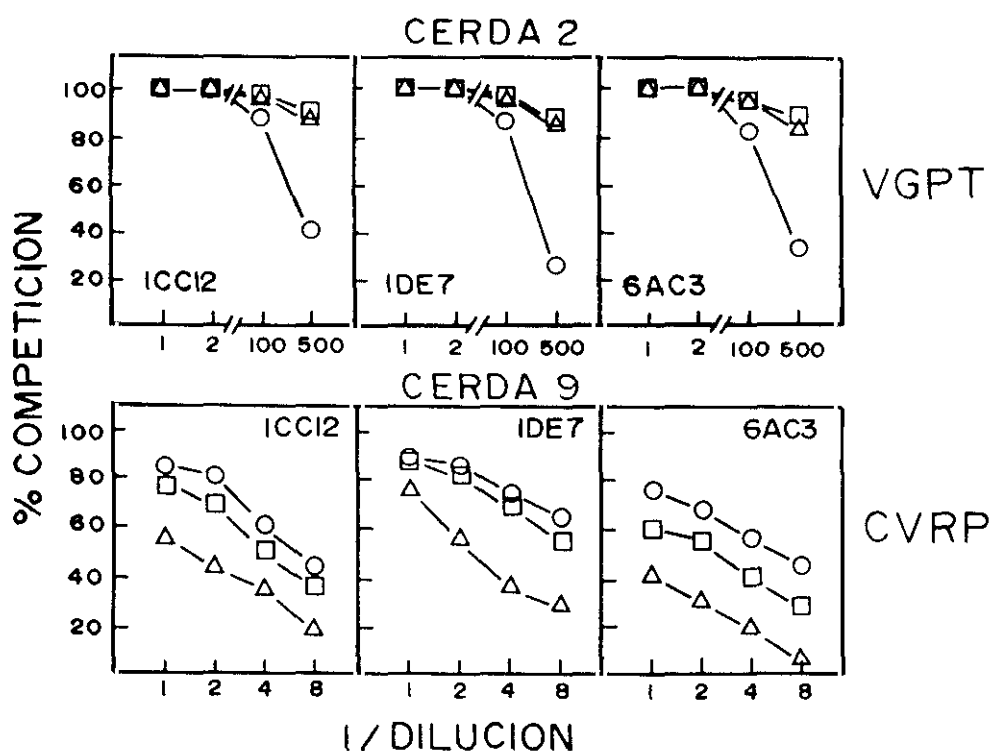


Figura 10.- Ensayos de unión competitiva al VGPT de diferentes diluciones de suero (○), calostro (□) y leche (Δ) de una cerda inmunizada con VGPT (cerda 2) y de una cerda inmunizada con CVRP (cerda 9) con AcMs específicos de los tres subsitios del sitio A, Aa (ICC12), Ab (IDE7) y Ac (6AC3), de la glicoproteína S, llevados a cabo para el establecimiento de las condiciones del ensayo.

En los resultados obtenidos de dichos ensayos, se observó que a altas concentraciones de los anticuerpos de la cerda inoculada con el virus entérico (cerda 2), los porcentajes de competición eran prácticamente del 100%, tanto para los anticuerpos circulantes como secretores, mientras que a altas diluciones se observaron diferencias entre los porcentajes de competición de ambos tipos de anticuerpos. Por lo tanto, para los ensayos con AcMs específicos de la glicoproteína S se escogieron las diluciones 1/1, 1/2, 1/100 y 1/500 de las muestras de suero, calostro y leche de las cerdas inoculadas con el VGPT, para poder estudiar las posibles diferencias entre las muestras de las cerdas pertenecientes a este grupo.

Sin embargo, para las muestras de las cerdas inoculadas con el CVRP se escogieron diluciones de 1/1 a 1/8 puesto que a diluciones mayores no eran capaces de competir la unión de los AcMs. A altas concentraciones fue posible observar diferencias en los porcentajes de competición entre las distintas muestras. Esto parece indicar que la respuesta inmunitaria frente a la proteína S fue mayor en las cerdas inoculadas con el VGPT que en cerdas inoculadas con el CVRP, lo que se confirmó después al emplear todo el panel de AcMs frente a la proteína S (ver apartado 1.2.2.).

1.2.1.2. AcMs específicos de las proteínas M y N

En este caso se escogieron tres de los AcMs específicos de la proteína M que posteriormente serían empleados para el estudio completo, específicos de epitopos comunes a ambos virus (el epítipo reconocido por el AcM 9DB4 está ausente en el CVRP), y los tres AcMs específicos de la proteína N de que se disponía, para llevar a cabo los ensayos de RIAC con el suero, calostro y leche de las dos cerdas empleadas en el apartado anterior, cada una representativa de un grupo de cerdas inmunizadas. Los resultados se muestran en la figura 11.

Para los ensayos con AcMs específicos de las proteínas M y N se escogieron las diluciones 1/1 a 1/8 para todas las cerdas y todos los AcMs, pues a altas diluciones los porcentajes de competición eran muy bajos para las muestras de las cerdas

pertenecientes al grupo I y no había competición para las muestras de las cerdas del grupo II. Estos resultados parecen sugerir que en el virus entérico las proteínas N y M son menos antigénicas que la proteína S, al menos para los epítomos hasta ahora analizados.

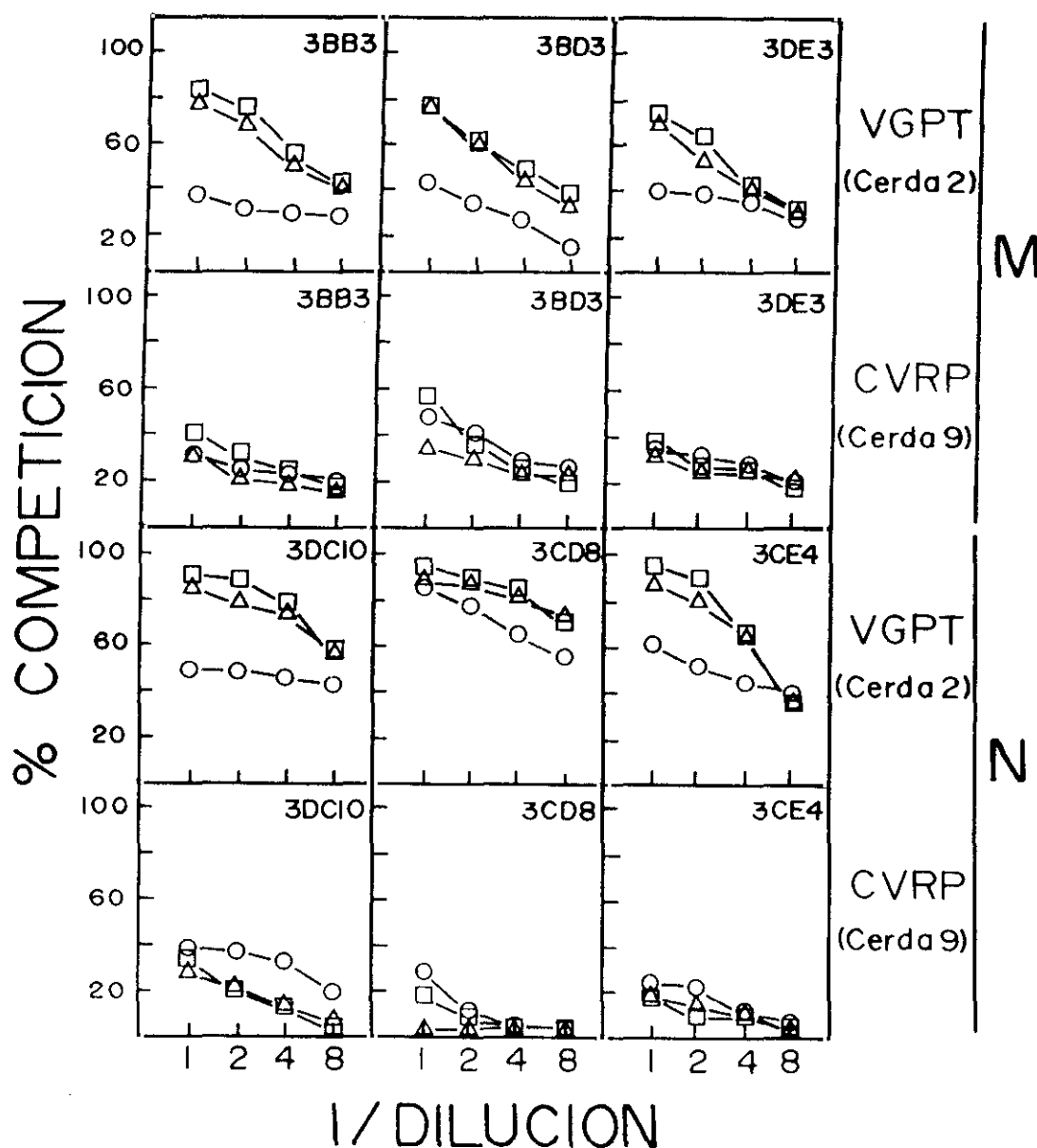


Figura 11.- Ensayos de unión competitiva al VGPT de diferentes diluciones de suero (O), calostro (□) y leche (Δ) de una cerda inmunizada con VGPT (cerda 2) y de una cerda inmunizada con CVRP (cerda 9) con AcMs específicos de las proteínas N y M, llevados a cabo para el establecimiento de las condiciones del ensayo.

1.2.2. Reconocimiento de epítomos de la proteína S

Dado que la glicoproteína S ha sido identificada como la principal inductora de anticuerpos neutralizantes (Delmas y col., 1986; Garwes y col., 1978/1979; Jiménez y col., 1986), es en teoría la más relevante en cuanto a protección. Por tanto, el análisis de los epítomos de esta glicoproteína reconocidos por los anticuerpos es de gran importancia. Los ensayos de RIAC se llevaron a cabo con AcMs específicos de los distintos sitios antigénicos de la proteína S. Los AcMs empleados definen los sitios antigénicos B y D, así como los subsitios antigénicos Aa, Ab y Ac. Así mismo, se empleó el AcM 8BE3, específico del sitio A pero no incluido dentro de ninguno de los subsitios definidos. El sitio B no fue estudiado en el caso de las cerdas inoculadas con el CVRP, por estar este sitio ausente en dicho virus (Fig. 12).

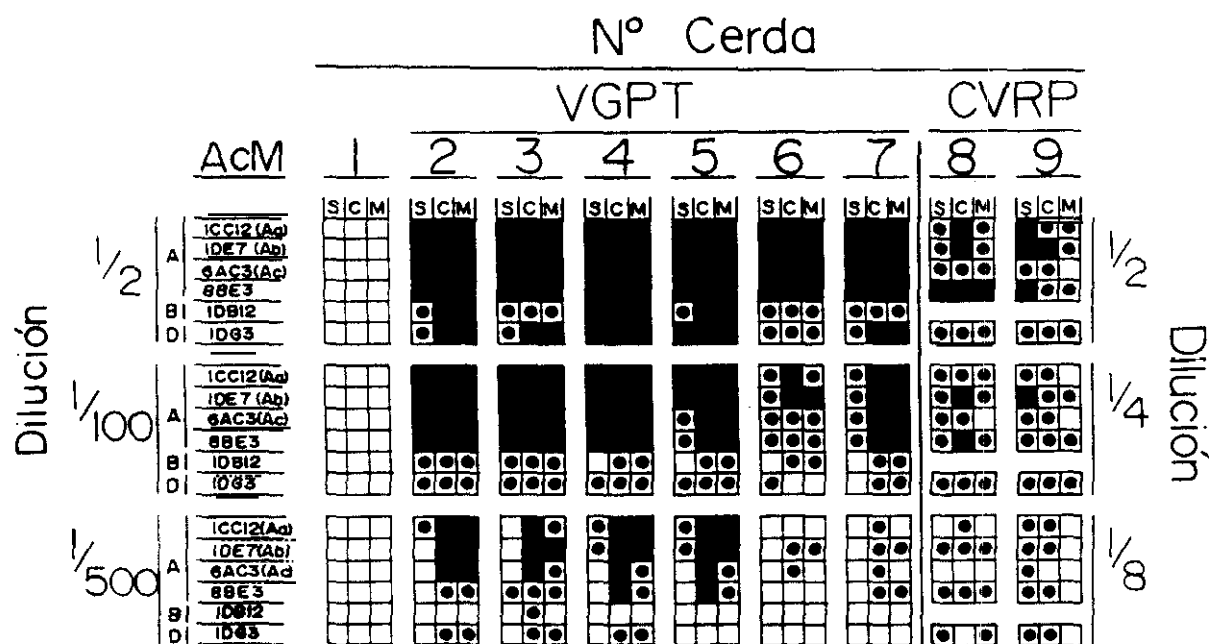


Figura 12.- Ensayos de unión competitiva al VGPT de diferentes diluciones de suero (S), calostro (C) y leche (M) de una cerda no inmunizada (1) y de cerdas inmunizadas con VGPT (2-7) o CVRP (8 y 9) con AcMs específicos de los sitios antigénicos A, B y D (el sitio B sólo en cerdas inmunizadas con el VGPT). Los AcMs ICC12, IDE7 y 6AC3 representan los subsitios antigénicos Aa, Ab y Ac, respectivamente. Los resultados se expresan como el porcentaje de competición mediante los símbolos: □, ◻ y ■, que representan porcentajes del 0-35%, 36-70% y 71-100% respectivamente.

En las cerdas vacunadas con el coronavirus entérico la respuesta inmunitaria frente a los epítomos estudiados fue mayor que en las cerdas vacunadas con el virus respiratorio. A la dilución 1/2 todos los AcMs que reaccionan con los diferentes subsitios del sitio antigénico A eran bloqueados en más de un 90% por los sueros, calostros y leches de todas las cerdas inmunizadas con el VGPT. La unión de los AcMs dirigidos frente a los sitios B y D fue menos inhibida por los anticuerpos procedentes de estas cerdas, con porcentajes de competición comprendidos entre el 60 y el 84% (Fig. 12). A diluciones mayores de los anticuerpos competidores, se observaron diferencias entre los porcentajes de competición obtenidos con anticuerpos circulantes y secretores en todas las cerdas. El subsitio antigénico Ab, definido por el AcM 1DE7, resultó ser el más inmunogénico ya que presentó los porcentajes de competición más altos para los anticuerpos secretores contenidos en los calostros y las leches de este grupo de cerdas.

En las cerdas vacunadas con el CVRP únicamente los AcMs específicos de algunos subsitios del sitio antigénico A fueron bloqueados con porcentajes de competición mayores de 70% cuando los anticuerpos competidores eran analizados a bajas diluciones (Fig. 12). Se encontraron diferencias en la especificidad de los anticuerpos circulantes y secretores de ambas cerdas inoculadas con el virus de tropismo respiratorio. En la cerda número 8, con una tasa de protección pasiva de aproximadamente el 60%, la capacidad de unión a la mayoría de los epítomos de la proteína S fue similar para anticuerpos circulantes y secretores (sólo de calostro). Sin embargo, en la cerda 9, que protegió alrededor de un 30% de sus lechones, la unión de los anticuerpos a los epítomos de la proteína S analizados fue mayor para los anticuerpos séricos circulantes que para los secretores (Fig. 12).

Para asegurarnos de que la vacunación de las cerdas con el CVRP había sido efectiva y el desarrollo de la respuesta inmune en estas cerdas el que cabía esperar, se realizaron ensayos de RIAC con AcMs específicos de la glicoproteína S con varios sueros de campo, de cerdos infectados naturalmente con CVRP, diluïdos a 1/2 y 1/4. Los resultados, que se muestran en la figura 13, demuestran que las competiciones

obtenidas con los sueros de las cerdas inoculadas experimentalmente eran similares a las obtenidas con los sueros de campo, por lo que consideramos que la respuesta inmunitaria inducida en estas cerdas era equivalente a la inducida por una infección natural.

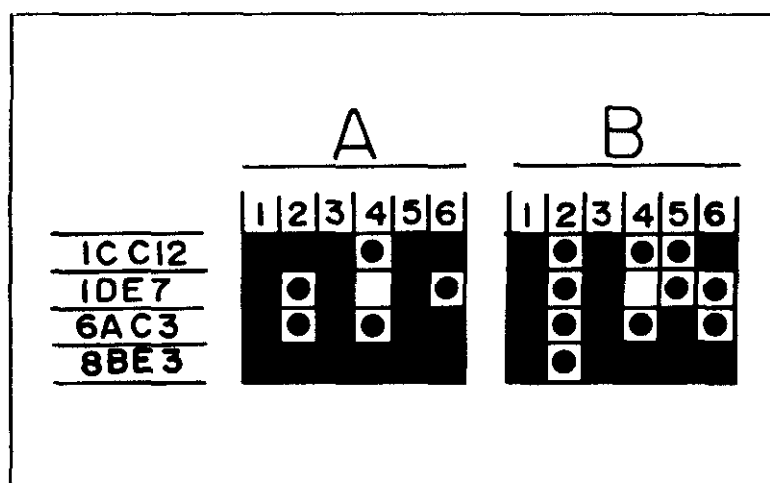


Figura 13.- Ensayos de unión competitiva al VGPT de varios sueros de campo de cerdos infectados por CVRP de forma natural, a las diluciones 1/2 (A) y 1/4 (B), con AcMs específicos de la glicoproteína S. Los símbolos: □, ◻ y ■ representan los mismos porcentajes de competición que en la figura 12.

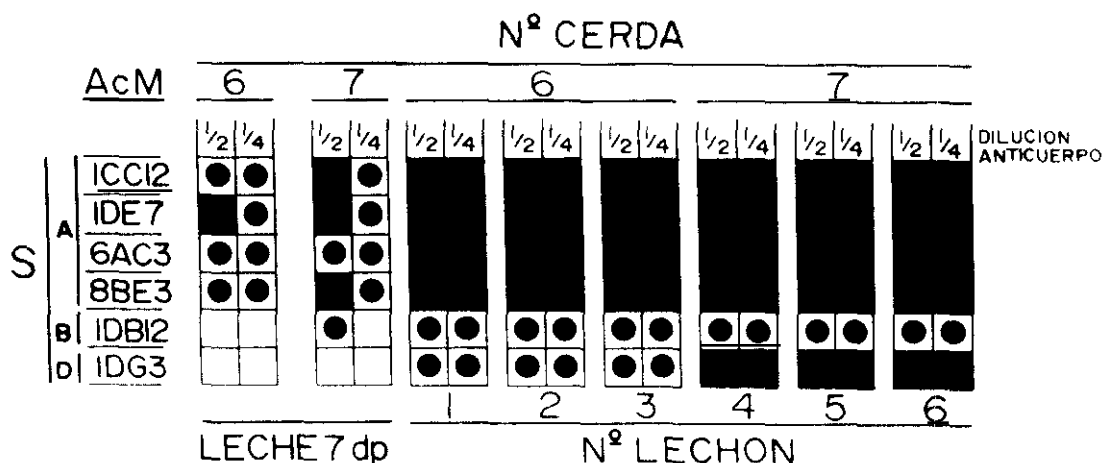


Figura 14.- Ensayos de unión competitiva al VGPT de la leche obtenida el día de la contraprueba, 7 días post-parto (dp) de las cerdas 6 y 7, inmunizadas con VGPT, y de los sueros obtenidos el día de la contraprueba de tres lechones nacidos de cada una de estas cerdas, a las diluciones 1/2 y 1/4, con AcMs específicos de la glicoproteína S. Los símbolos: □, ◻ y ■ representan los mismos porcentajes de competición que en la figura 12.

La leche obtenida de las cerdas 6 y 7 en el día de la contraprueba de los lechones, 7 días después del parto, presentó un descenso en el nivel de los anticuerpos específicos frente a la proteína S, mostrando porcentajes de competición mucho más bajos, incluso a altas concentraciones (1/2 y 1/4) (Fig. 14). La unión de los AcM 1DB12 y 1DG3, específicos de los sitios B y D respectivamente, fue poco competida por los anticuerpos específicos de la leche recogida en este momento.

Los lechones, que al nacer son agammaglobulinémicos (Newby y col., 1982), absorben a través del intestino delgado anticuerpos del calostro y la leche de sus madres durante las primeras 24-36 horas de vida. La absorción de los anticuerpos específicos por los lechones lactantes resultó ser muy eficiente, como se determinó por los RIAC llevados a cabo con los sueros obtenidos en el día de la contraprueba y AcM específicos de los distintos sitios y subsitios antigénicos (Fig. 14). Los porcentajes de competición de los sueros, siete días después del parto, a la dilución 1/4, fueron mayores del 90% para el sitio A y entre el 50 y el 80% para los sitios B y D, muy superiores a los de la leche que en este momento ingerían.

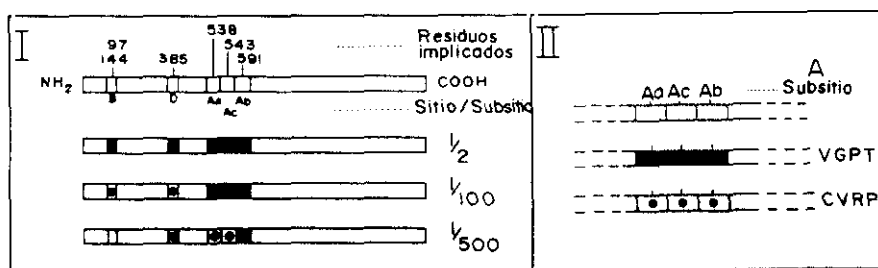


Figura 15.- Esquema de la representación, en anticuerpos secretorios, de los diferentes sitios y subsitios antigénicos de la glicoproteína S, localizados en la secuencia de dicha proteína, como se deduce de la media de los valores de competición obtenidos a diferentes diluciones de la leche de cerdas inoculadas con el VGPT (panel I). El panel II muestra comparativamente la representación de los subsitios antigénicos del sitio A en la glicoproteína S en los anticuerpos de la leche de cerdas inoculadas con el VGPT y el CVRP, como se deduce de la media de los porcentajes de competición a la dilución 1/2 con los AcMs que se muestran en la figura 12. Los símbolos: □, ◻ y ■ representan los mismos porcentajes de competición que en la figura 12.

La figura 15 muestra un esquema del reconocimiento de los sitios antigénicos de la proteína S por los anticuerpos secretores presentes en la leche de las cerdas inoculadas con el VGPT y el CVRP. El sitio antigénico A, y especialmente el subsitio Ab, fue el más inmunogénico (Fig. 15I). En la figura 15II se muestra también una comparación de la representación de los subsitios antigénicos del sitio A en los Acs presentes en leche tanto de cerdas vacunadas con el VGPT como con el CVRP.

1.2.3. Reconocimiento de epítomos de las proteínas M y N

Para este estudio se llevaron a cabo ensayos de RIAC con AcMs específicos de las proteínas N y M y anticuerpos secretores y circulantes obtenidos de ambos grupos de cerdas.

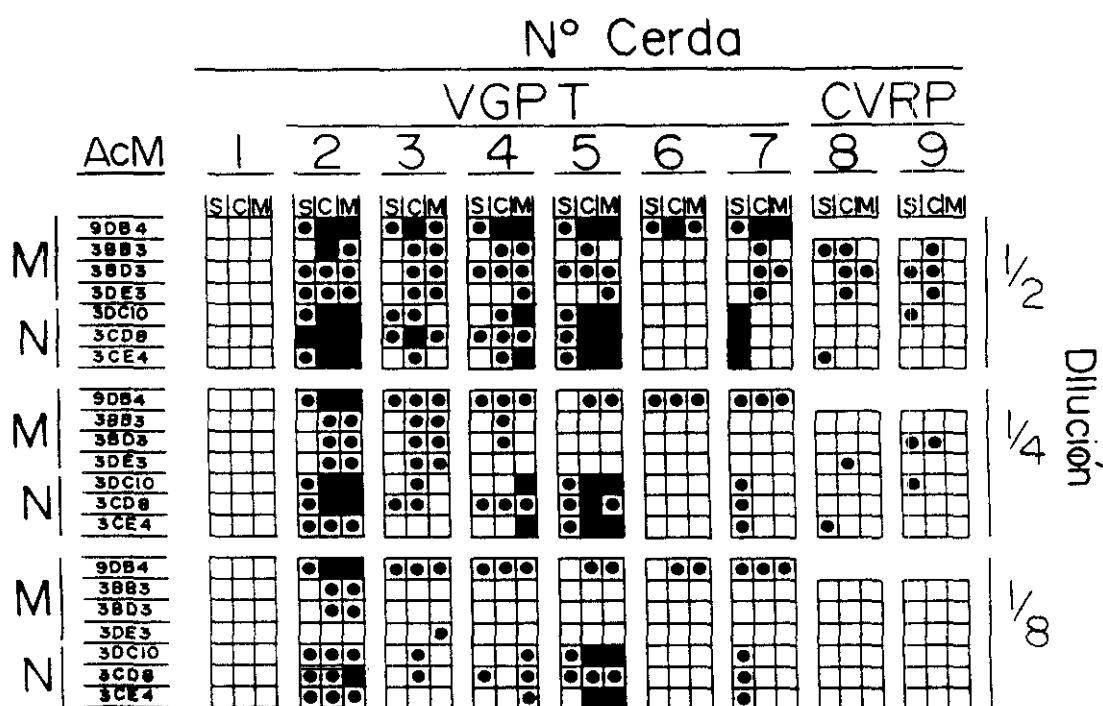


Figura 16.- Ensayos de unión competitiva al VGPT de diferentes diluciones de suero (S), calostro (C) y leche (M) de una cerda no inmunizada (1) y de cerdas inmunizadas con VGPT (2-7) o CVRP (8 y 9) con AcMs específicos de las proteínas M y N. El AcM 9DB4 no fue empleado para las cerdas inmunizadas con el CVRP ya que este virus carece de dicho epítomo. Los resultados se expresan como el porcentaje de competición. Los símbolos □, ◻ y ■ representan los mismos porcentajes de competición que en la figura 12.

La antigenicidad de los epítomos analizados para las proteínas N y M fue menor que la de los epítomos estudiados para la proteína S. Esto fue así tanto para el virus entérico como para el virus de tropismo respiratorio. La mayoría de los anticuerpos secretados específicos de la proteína M en cerdas inmunizadas con el VGPT eran específicos del epítomo definido por el AcM 9DB4 (Fig. 16), que está ausente en el CVRP. En general, con la excepción de la cerda 6, en que los porcentajes de competición de la unión al virus de los distintos AcM específicos de las proteínas N y M fueron muy bajos, la proteína N fue más inmunogénica que la proteína M en las cerdas vacunadas con el VGPT. Para la proteína N la respuesta de anticuerpos frente a los distintos epítomos fue muy variable entre las cerdas vacunadas con el virus entérico. Resulta interesante notar que en la cerda 7 se observó una selección preferencial de una respuesta de anticuerpos circulantes, esto es, sistémica, frente a esta proteína (Fig. 16).

Sin embargo, en cerdas vacunadas con el CVRP la proteína M fue más inmunogénica que la proteína N para los epítomos analizados. Unicamente se detectó una respuesta de anticuerpos frente a estas proteínas en suero y calostro en estas dos cerdas. El epítomo de la proteína M definido por el AcM 3DE3 resultó ser el único representado en los anticuerpos presentes en el calostro de ambas cerdas de este grupo y lo mismo se cumplió para el epítomo definido por el AcM 3BB3 en el calostro de la cerda número 9.

2. INDUCCION DE LAS DISTINTAS CLASES DE Ig EN GALT Y BALT POR LOS EPITOPOS IMPLICADOS EN LA NEUTRALIZACION DEL VGPT

2.1. PURIFICACION DE CLASES DE Ig

Para poder determinar qué epítomos de los implicados en la neutralización del virus (epítomos pertenecientes a los sitios antigénicos A, B y D de la glicoproteína S), son los mejores inductores de IgA-S, así como para estudiar la inducción selectiva de

otras clases de inmunoglobulina con posible importancia en protección lactogénica durante la respuesta inmunitaria, se llevaron a cabo ensayos de ELISAc con las distintas clases de inmunoglobulina purificadas a partir de las secreciones lácteas de las cerdas vacunadas.

Esta purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad empleando AcMs específicos de cada clase y subclase de inmunoglobulina. Una vez obtenidas y dializadas las distintas muestras de inmunoglobulinas purificadas se analizó su pureza por medio de la técnica ELISA empleando de forma cruzada los mismos AcMs. En la figura 17 se muestran los resultados obtenidos para las Igs purificadas a partir del calostro de una de las cerdas (cerda 4), donde se comprueba que las clases y subclases de inmunoglobulina estaban totalmente purificados, no existiendo contaminación de unas con otras. Los resultados fueron similares para las inmunoglobulinas purificadas de leche y calostro del resto de las cerdas.

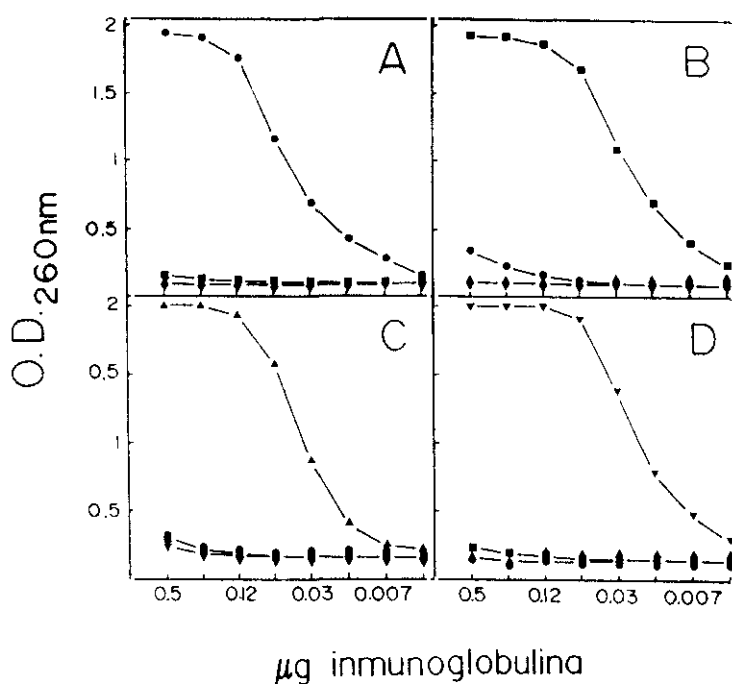


Figura 17.- Determinación de la pureza de las muestras de inmunoglobulinas purificadas mediante cromatografía de afinidad, IgA (A), IgM (B), IgG₁ (C) e IgG₂ (D), a partir del calostro de la cerda 4, por medio de la técnica de ELISA, donde los símbolos ●, ■, ▲, y ▼ representan el revelado con los AcMs específicos de IgA, IgM, IgG₁ e IgG₂, respectivamente.

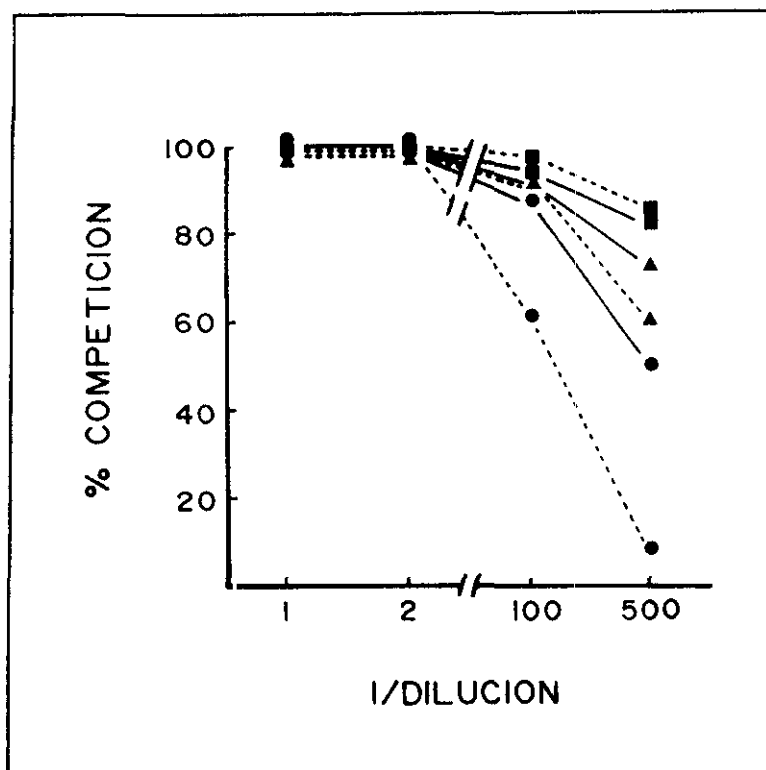
2.2. PUESTA A PUNTO DEL ELISAc

Una vez purificadas las clases y subclases de inmunoglobulina a partir de todas las muestras de calostro y leche se llevaron a cabo los ensayos de unión competitiva al VGPT. La técnica empleada en este caso fue la de ELISAc. Para asegurarnos de que la técnica era igualmente válida que el RIAC para la finalidad perseguida se llevó a cabo un ensayo de competición de la unión del AcM ICC12 (específico del subsitio Aa) al VGPT, por ambas técnicas, con el suero y la leche de una de las cerdas vacunadas con el VGPT (cerda 4). Se emplearon las condiciones previamente establecidas para los ensayos de RIAC, excepto que el ELISAc se realizó en 2 pasos (incubación previa del anticuerpo procedente de las cerdas).

En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos, que fueron similares para ambas técnicas. Únicamente se obtuvieron por ELISAc porcentajes de competición mayores que por RIAC para el suero a altas diluciones, debido a que el ensayo fue realizado en 2 pasos. En todos los demás casos los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron equivalentes.

En el presente estudio se pretendía conocer fundamentalmente la inducción de las diferentes clases y subclases de Ig por parte de los distintos epítomos, tanto si la presentación antigénica tenía lugar en BALT o en GALT. Con este motivo los ensayos se realizaron en 2 pasos, con el fin de favorecer la unión de los anticuerpos competidores, independientemente de su afinidad por los distintos epítomos. La comparación con los resultados obtenidos al realizar los mismos ensayos en 1 paso daría una indicación de la calidad de estos anticuerpos. Con la finalidad de estudiar factores cuantitativos los ensayos se realizaron igualando las concentraciones de todas las muestras, analizándose diferentes concentraciones de las inmunoglobulinas purificadas (75, 50, 25, 10, 5 y 2 μ g) para determinar si eran capaces de bloquear y, en caso positivo, en qué grado, la unión de AcMs específicos de los sitios antígenicos B y D y los subsitios Aa, Ab y Ac del sitio antigénico A.

Figura 18.- Curvas de competición de la unión del AcM ICC12, específico del subsitio Aa del sitio A de la glicoproteína S, obtenidas con el suero (●), calostro (■) y leche (▲) de la cerda 4, a distintas diluciones. Las líneas continuas representan la curva obtenida por medio de la técnica de RIAC, mientras que las líneas discontinuas representan las curvas obtenidas por medio de la técnica de ELISAc.



2.3. ESPECIFICIDAD DE LAS CLASES Y SUBCLASES DE Ig INDUCIDAS TRAS PRESENTACION ANTIGENICA EN GALT

Las clases de inmunoglobulina IgM, IgA y las subclases de IgG, IgG₁ e IgG₂, fueron purificadas a partir de calostro y leche obtenida en el día posterior al parto de dos cerdas vacunadas con el VGPT (números 4 y 6), que protegieron el 100% de sus lechones tras la contraprueba con virus virulento, y de una cerda, vacunada con el mismo virus, que protegió el 80% de su progenie frente a la muerte causada por la GPT (cerda 7). Los resultados obtenidos de los ensayos de unión competitiva, previamente descritos, con las Igs purificadas a partir del calostro y la leche se muestran en la figura 19.

En la cerda número 4 la respuesta específica de las diferentes clases de inmunoglobulina secretora frente a los epítomos estudiados fue ligeramente superior que

en las otras dos cerdas, como se deduce de los datos de porcentajes de competición mostrados por todas las clases y subclases de inmunoglobulina purificadas a partir de calostro y leche de esta cerda. Estos datos concuerdan con los resultados previamente obtenidos a partir de calostro y leche completos.

En las tres cerdas ambos sitios antigénicos A y D fueron los mejores inductores de IgA-S, siendo el sitio A mejor inductor que el sitio D. Ambos sitios antigénicos fueron buenos inductores de IgG en calostro y leche, siendo esto especialmente patente en las cerdas números 6 y 7, que presentaron una respuesta IgG mayor que la respuesta de anticuerpos de clase IgA. Es interesante el hecho de que, para la cerda 4, que fue capaz de proteger a algunos de sus lechones frente a la infección con VGPT virulento, la respuesta inmune frente a los epítomos del VGPT analizados fue principalmente de clase IgA: 2,5 µg de IgA-S purificada a partir de la leche de esta cerda presentaron porcentajes de bloqueo mayores del 70% para todos los AcMs que definen los subsitios antigénicos pertenecientes al sitio A y al sitio D.

No se observaron diferencias significativas en los porcentajes de competición obtenidos con las dos subclases de IgG, que fueron igualmente inducidas por los diferentes epítomos ensayados. No obstante, el sitio antigénico A fue ligeramente mejor inductor de IgG₁, como demuestran los porcentajes de competición obtenidos con el empleo de bajas concentraciones (5 y 2,5 µg) de los anticuerpos competidores.

Los porcentajes de competición obtenidos con las IgMs purificadas empleadas a altas concentraciones presentaron una correlación directa con los porcentajes de competición obtenidos con las IgAs secretoras procedentes de la misma muestra. La IgM purificada de la cerda 4 presentó porcentajes de bloqueo de los AcMs específicos del sitio antigénico A mucho mayores que los de las IgMs purificadas a partir de la leche de las otras dos cerdas, llegando incluso a ser superiores, para 75 µg y 50 µg, al 70% de bloqueo de los AcMs que definen los subsitios Aa y Ab. Sin embargo, empleando 25 µg o cantidades menores de IgM purificada los porcentajes de competición obtenidos no fueron significativos (menores del 35%).

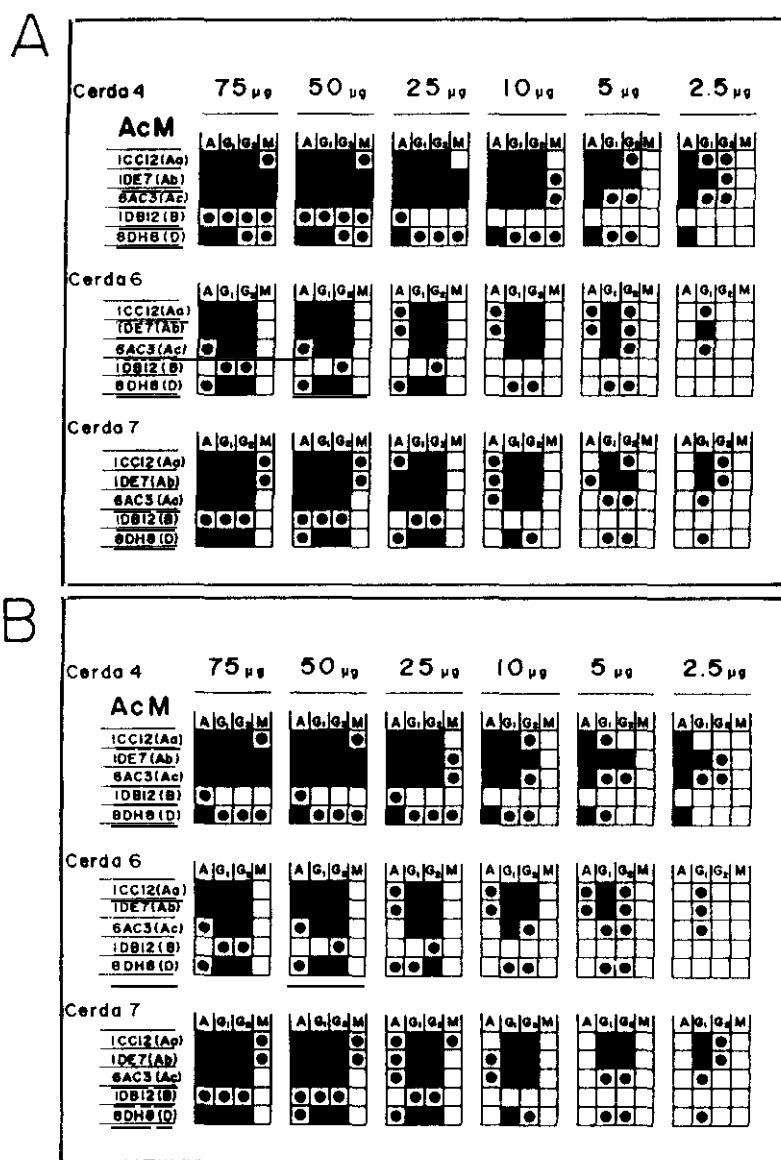


Figura 19.- Ensayos de unión competitiva al VGPT de diferentes diluciones de IgA, IgG₁, IgG₂ e IgM purificadas a partir de calostro (A) y leche (B) de cerdas vacunadas con VGPT (números 4, 6 y 7), con AcMs específicos de los sitios antigénicos A, B y D de la glicoproteína S. Los símbolos □, ◻ y ■ representan los mismos porcentajes de competición que en la figura 12.

2.4. ESPECIFICIDAD DE LAS CLASES Y SUBCLASES DE Ig INDUCIDAS TRAS PRESENTACION ANTIGENICA EN BALT

Las clases y subclases de inmunoglobulina IgM, IgA, IgG₁ e IgG₂ fueron purificadas a partir del calostro y la leche obtenida el día posterior a parto de las dos cerdas vacunadas con el CVRP, cerdas números 8 y 9, que confirieron una protección lactogénica parcial frente a la GPT del 62,5 y 28,5% de los lechones, respectivamente, tras la contraprueba con el virus virulento. Con el fin de encontrar denominadores comunes con la respuesta inmune inducida en GALT por el virus de tropismo entérico en cuanto a la clase de inmunoglobulina inducida por los distintos epítomos ya mencionados, excepto para el sitio B, ausente en el CVRP, se llevaron a cabo ensayos de ELISAc como se ha descrito previamente. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 20.

La inducción en GALT de anticuerpos específicos frente a los epítomos estudiados fue mucho mayor que la inducción en BALT, como demuestran los porcentajes de competición mucho menores obtenidos con los anticuerpos procedentes de cerdas vacunadas con el CVRP, realizándose las competiciones con cantidades iguales de inmunoglobulinas purificadas de las cerdas vacunadas con el VGPT. Estos datos concuerdan con los previamente obtenidos con los sueros, calostros y leches totales.

Ambos sitios antigénicos A y D, como ya se había observado en la cerdas inoculadas con el VGPT, fueron los mejores inductores de anticuerpos de la clase IgA-S, siendo, en este caso, el sitio D y el subsitio Ab, definidos por los AcMs 8DH8 y 1DE7, respectivamente, los mejores inductores de esta clase de inmunoglobulina, presentando porcentajes de bloqueo para 75 µg de Ig purificada mayores del 70%. Ambos sitios antigénicos indujeron también las dos subclases de IgG, pero en menor grado que IgA-S. El sitio D fue el mejor inductor de IgG en leche. Como ocurría para los anticuerpos inducidos por el VGPT, se observó una ligera preferencia hacia la

inducción de IgG₁ más que de IgG₂. Los anticuerpos de clase IgM no mostraron porcentajes de competición significativos para ninguno de los epítomos estudiados.

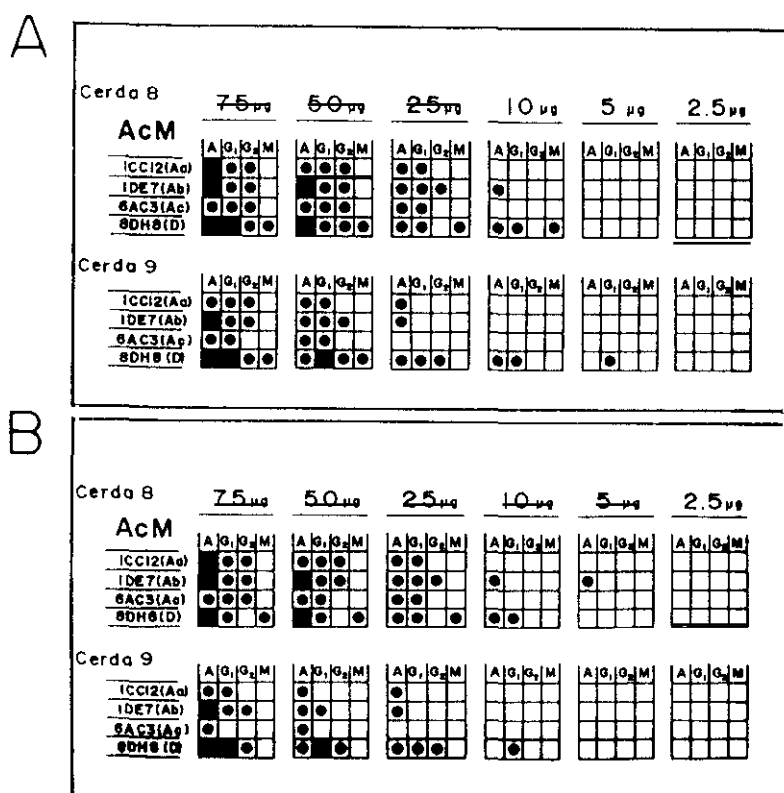


Figura 20.- Ensayos de unión competitiva al VGPT de diferentes diluciones de IgA, IgG₁, IgG₂ e IgM purificadas a partir de calostro (A) y leche (B) de cerdas vacunadas con CVRP (números 8 y 9), con AcMs específicos de los sitios antigénicos A y D de la glicoproteína S. El sitio B está ausente en el CVRP. Los símbolos □, ◻ y ■ representan los mismos porcentajes de competición que en la figura 12.

2.5. COMPARACION DE LA INDUCCION DE ANTICUERPOS TRAS PRESENTACION ANTIGENICA EN GALT O EN BALT

En la figura 21 se muestra un esquema comparativo de la especificidad frente a los diferentes epítomos de la proteína S de las distintas clases de inmunoglobulinas secretadas presentes en calostro y leche tras la estimulación en GALT o BALT de cerdas gestantes.

Cuando el virus replica en el tracto gastrointestinal y, por tanto, el estímulo se produce en GALT, la respuesta inmune de tipo IgA-S es similar frente al sitio D y los tres subsitios antigénicos del sitio A, mientras que la estimulación en BALT, por la replicación del CVRP en el tracto respiratorio, resulta en una respuesta inmune de tipo

IgA-S preferencialmente dirigida frente al sitio D y al subsitio Ab. Ambos sitios antígenicos, A y D, fueron también buenos inductores de IgG en leche de cerdas vacunadas con el virus de tropismo entérico.

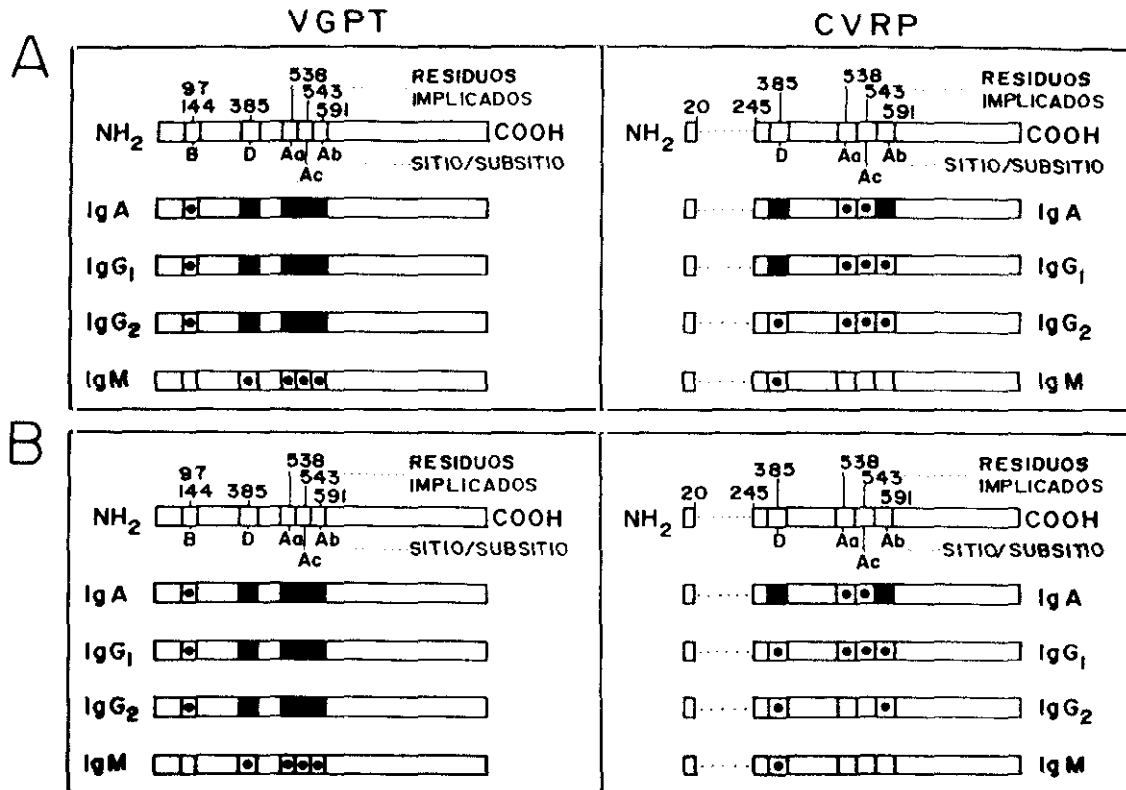


Figura 21.- Esquema del reconocimiento de los diferentes sitios y subsitios antígenicos de la glicoproteína S por las distintas clases de Ig secretoras purificadas, localizados en la secuencia de dicha proteína, como se deduce de la media de los valores de los porcentajes de competición obtenidos con 75 µg de Ig purificada a partir de calostro (A) y leche (B) de cerdas vacunadas con VGPT y CVRP con los AcMs específicos de la proteína S. Los símbolos representan los mismos porcentajes de competición que en las figuras previas.

La antigenicidad del sitio B (únicamente presente en el VGPT) fue menor que la de los otros sitios y subsitios antígenicos, ya que los porcentajes de competición obtenidos para todas las clases de inmunoglobulina purificadas nunca sobrepasaron el 50% de bloqueo de los AcMs correspondientes.

3. DEFINICION DE LAS CARACTERISTICAS DE LAS Igs RELEVANTES EN PROTECCION *IN VIVO*.

Las consecuencias del reconocimiento de los distintos sitios antigénicos en la protección, tanto *in vitro* como *in vivo*, se estudiaron mediante el empleo de IgA-S e IgG con distinta especificidad epitópica obtenidas a partir de la leche, tras la estimulación en GALT o en BALT de cerdas gestantes .

3.1. AFINIDAD

En la Fig. 22A se muestra un esquema de la especificidad de las clases de inmunoglobulina purificadas empleadas en los ensayos de protección. Se analizó la IgA-S purificada de la leche recogida en el día 1 tras el parto de las cerdas 4, 7 (vacunadas con el VGPT) y 8 (vacunada con el CVRP), así como las IgG e IgA-S de la cerda 7 purificadas a partir de las leches obtenidas en los días 1 y 7 post-parto, respectivamente. En este estudio se compararon los resultados obtenidos en los ensayos de competición realizados en 1 o 2 pasos con un exceso de Acs purificados (75 µg) con el fin de determinar, no sólo la cantidad sino también la afinidad de los anticuerpos secretadores específicos de los epítomos estudiados.

La IgA-S, específica del sitio antigénico A, de leche recogida el día 1 post-parto de la cerda número 7, no obtenía ventaja en el ensayo realizado en dos pasos en cuanto al bloqueo de la unión de los AcMs específicos de los subsitios antigénicos del sitio A, ya que se obtuvieron porcentajes de competición mayores del 77% en los ensayos llevados a cabo tanto en 1 como en 2 pasos.

En el mismo caso se encuentra la IgG purificada de esta misma muestra. Por el contrario, se encontró un ligero aumento de los porcentajes de bloqueo de los AcMs 1DB12 y 8DH8 (que definen los sitios B y D, respectivamente) obtenidos con la IgA-S obtenida el primer día después del parto cuando el ensayo de competición se realizaba en dos pasos, dando ventaja al anticuerpo porcino de unirse al virus antes que el AcM.

En este caso los porcentajes de competición presentaron incrementos del 22 al 47% para el sitio B y del 66 al 78% para el sitio antigénico D.

La IgA-S purificada a partir de la leche recogida el séptimo día tras el parto de la cerda número 7 mostró un bloqueo mucho más eficiente de la unión de los AcMs cuando se le permitía unirse al virus en ausencia de los AcMs correspondientes, lo que indica una menor afinidad de los anticuerpos secretores presentes en esta muestra comparados con los pertenecientes a la leche del día 1. Esto fue especialmente notorio para los anticuerpos específicos de los subsitios Aa y Ab, con porcentajes de competición que pasaron del 58 al 76% y del 40 al 78%, respectivamente; así como para los específicos del sitio D con aumentos en los porcentajes de competición del 24 al 61%. Los porcentajes de competición de la unión del AcM específico del subsitio Ac presentaron una ligera variación del 53 al 69% en los ensayos en 1 paso y 2 pasos, respectivamente.

Los porcentajes de bloqueo del AcM 8DH8 obtenidos con IgA-S específica del sitio D inducida por el CVRP no presentaron variaciones significativas en los ensayos realizados en 1 o 2 pasos, compitiendo un 73 y un 71%, respectivamente. Sin embargo, se observaron grandes diferencias entre las competiciones obtenidas para el AcM 1DE7, específico del subsitio Ab, con variaciones en los porcentajes del 37 al 71%, así como para el subsitio Ac con una variación de los porcentajes de competición del 23 al 56%, cuando la técnica se llevaba a cabo en 1 o 2 pasos, respectivamente.

3.2. PROTECCION *IN VITRO*

Con el fin de correlacionar el reconocimiento antigénico (de epítomos) entre las distintas clases de inmunoglobulina purificadas y tanto para la protección *in vitro* de células como *in vivo* de lechones, se emplearon IgA-S e IgG secretadas con diferente especificidad obtenidas a partir de la leche de las cerdas tras la estimulación en GALT y BALT con VGPT o CVRP, respectivamente (ver apartado anterior).

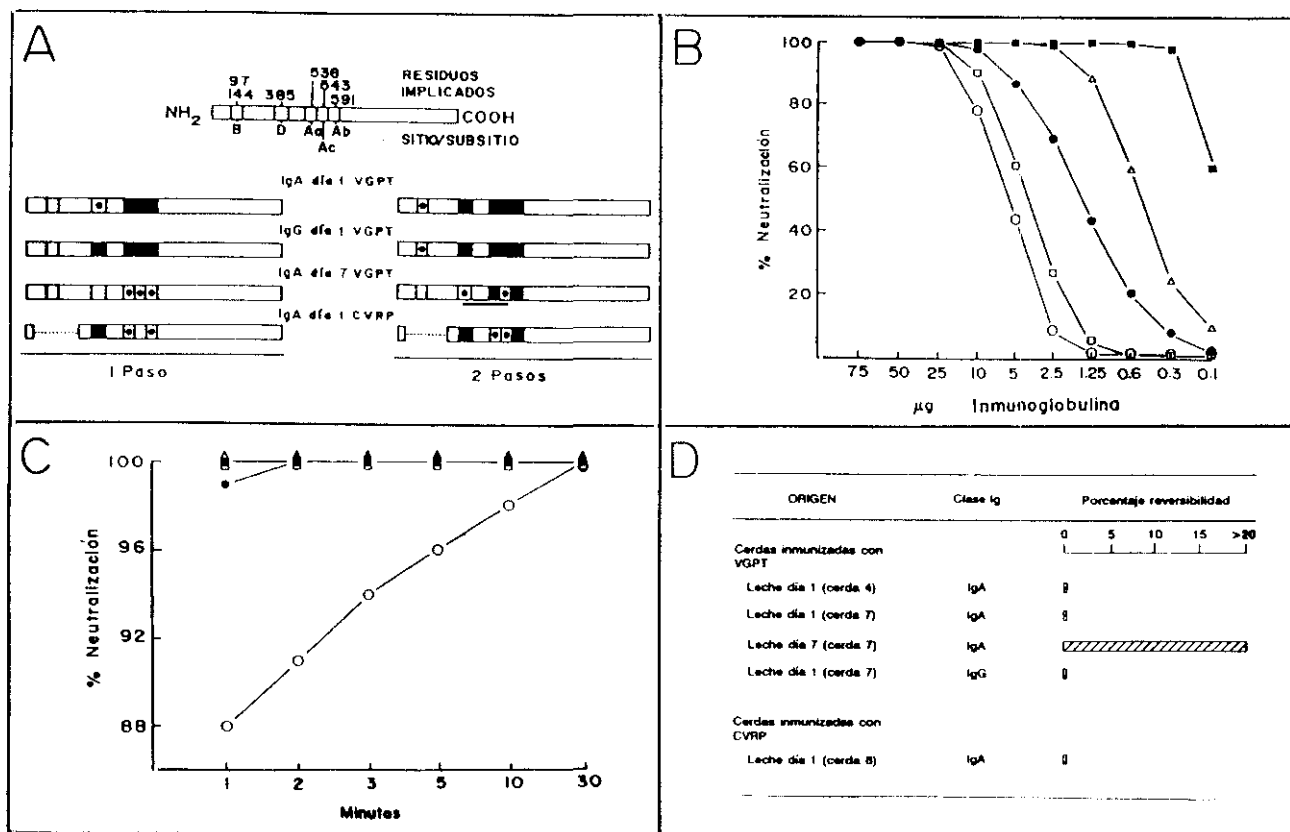


Figura 22.- Propiedades de las distintas clases y subclases de Ig secretadas inducidas por la infección por VGPT o CVRP en cerdas gestantes.

(A) Esquema de las clases y subclases de Ig secretoras inducidas por los distintos sitios y subsitios antigénicos de las glicoproteínas S del VGPT y CVRP, localizados en las secuencias de dichas proteínas, como se deduce de la media de los porcentajes de competición obtenidos con 75 μ g de Igs purificadas de la leche de cerdas vacunadas con VGPT y CVRP y los AcMs específicos de la proteína S. En el esquema se representan los resultados obtenidos cuando el ensayo se realizó en 1 o 2 pasos.

(B) Curvas de neutralización obtenidas por medio de ensayos de reducción del número de placas con: IgA-S purificada a partir de leche recogida el primer día post-parto de las cerdas inmunizadas con VGPT números 4 (■) y 7 (□) y de la cerda 8 inmunizada con CVRP (●); IgG purificada de la leche obtenida el día 1 post-parto de la cerda 7 (Δ); e IgA-S obtenida a partir de la leche de la cerda 7 recogida 7 días después del parto (○).

(C) Cinética de neutralización del VGPT obtenida con 50 μ g de las distintas clases de Ig purificadas. Los símbolos representan las mismas muestras que en B.

(D) Porcentajes de reversibilidad de la neutralización del VGPT obtenidos por dilución de los complejos virus-anticuerpo para permitir la disociación. Los porcentajes fueron calculados como el incremento del número de placas obtenidas tras la dilución referido al número de placas obtenidas sin diluir.

3.2.1. Título de neutralización

Para el estudio de la protección *in vitro* de células ST se realizaron ensayos de reducción del número de placas (10^2 PFU de VGPT) en presencia de concentraciones idénticas de todas las clases y subclases de inmunoglobulina purificadas a partir de calostro y leche de los dos grupos de cerdas. En la figura 23 se muestran las curvas de neutralización obtenidas con las inmunoglobulinas purificadas de 2 cerdas representativas del grupo I (cerdas 4 y 7) y de las 2 cerdas del grupo II (cerdas 8 y 9).

La IgA-S de la cerda número 4 purificada a partir de la leche recogida el día 1 post-parto fue la que mostró el título de neutralización más alto. En cuanto a las IgA-S purificadas de la leche tanto del día 1 como del día 7 tras el parto de la cerda número 7 fueron igualmente capaces de proteger a las células ST, aunque el título de neutralización era menor que el de la IgA-S obtenida de la cerda número 4. Los títulos de neutralización obtenidos con las subclases IgG₁ e IgG₂ purificadas de la leche del día 1 recogida de la cerda 7, mostraron títulos mayores que la IgA-S obtenida de la misma muestra de leche. La IgA-S inducida tras la estimulación en BALT mostró un título de neutralización *in vitro* similar, o ligeramente superior, al de la IgA-S inducida tras la estimulación en GALT en la cerda 7 (Fig. 22B).

3.2.2. Cinética de la neutralización

Se encontraron interesantes diferencias entre las distintas muestras de inmunoglobulina analizadas cuando se estudió la cinética de neutralización y la reversibilidad de esta, por dilución del complejo virus anticuerpo (Fig. 22C). La IgA-S inducida en GALT, obtenida de la leche del día 7 (cerda 7) mostró una cinética de neutralización más lenta que la del resto de las Igs estudiadas, únicamente alcanzando el 100% de neutralización tras un período de incubación de 30 min, mientras que las IgA-S e IgG purificadas de la leche obtenida el día 1 neutralizaron el 100% de la infectividad vírica durante el primer minuto de la reacción. La IgA inducida tras la estimulación en BALT logró una neutralización completa del virus tras 2 minutos de

incubación. Estos resultados parecen indicar una menor afinidad de la IgA inducida en BALT, con respecto a la IgA inducida en GALT, así como una disminución de la afinidad de la IgA a lo largo de la lactancia (IgA obtenida el día 7). Estos resultados fueron concordantes con los obtenidos en los ensayos de competición.

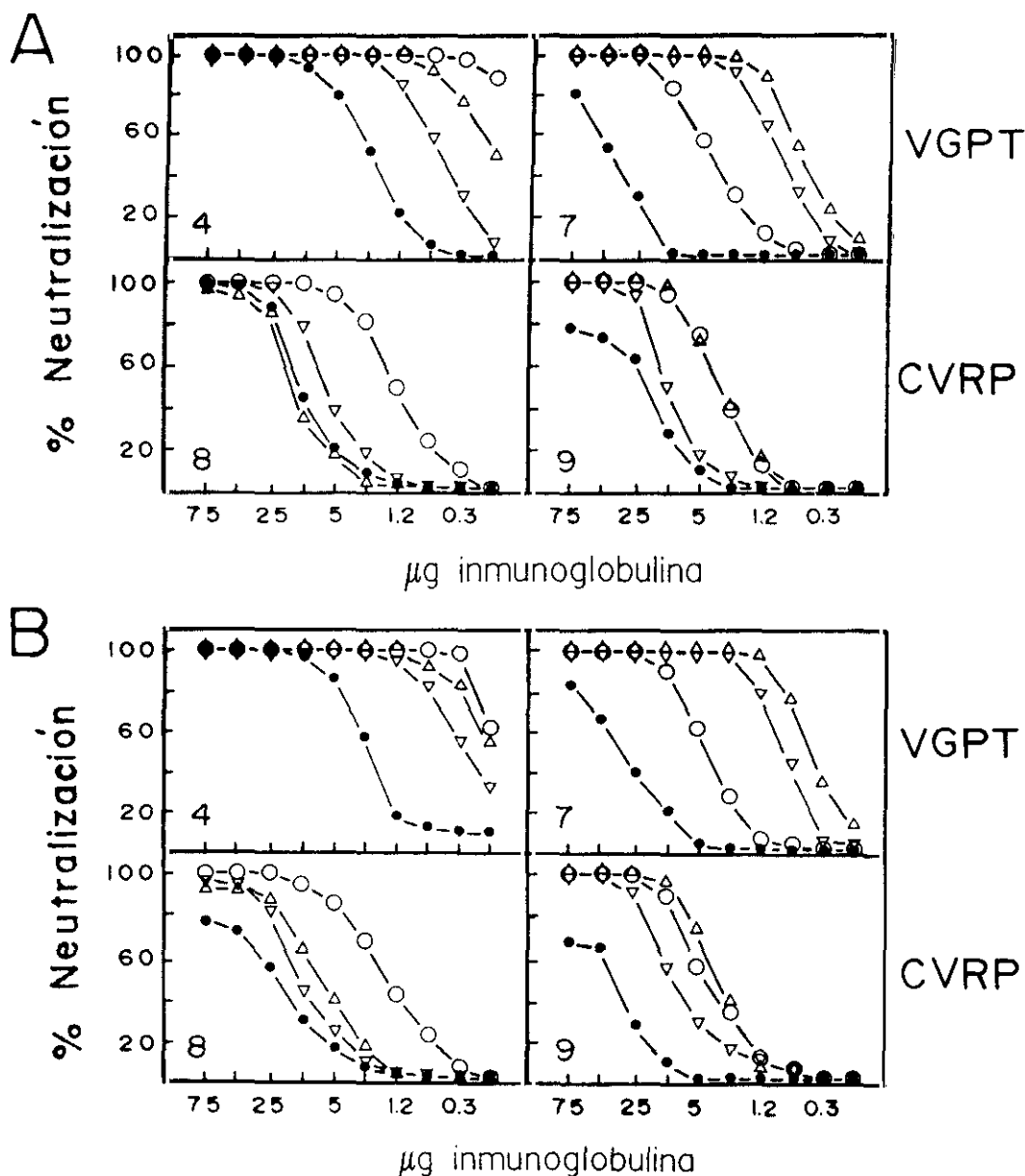


Figura 23.- Curvas de neutralización (expresada como la reducción del número de placas de 10^2 PFU de VGPT) obtenidas con diluciones seriadas de las clases y subclases de Ig (IgA, O; IgM, •; IgG₁, Δ; IgG₂, ▼) purificadas a partir de calostro (A) y leche (B) obtenidos de dos cerdas inmunizadas con VGPT virulento (cerdas 4 y 7) y de las dos cerdas inmunizadas con CVRP (cerdas 8 y 9).

3.2.3. Reversibilidad de la neutralización

Los resultados indicativos de la afinidad de los anticuerpos fueron corroborados por los datos de reversibilidad de la neutralización del VGPT por dilución de los complejos virus-anticuerpo. Únicamente cuando se empleó anticuerpo neutralizante de clase IgA-S obtenida de la leche del día 7 post-parto la neutralización revirtió al menos un 20%, mientras que la neutralización por parte del resto de las inmunoglobulinas purificadas resultó ser irreversible bajo estas condiciones experimentales (Fig. 22D).

3.3 ENSAYOS DE PROTECCION *IN VIVO*

Finalmente se realizaron experiencias de protección *in vivo* de lechones con las diferentes clases de Ig. Las clases de Ig purificadas fueron incubadas con el VGPT virulento MAD 88 durante 1 h a 37° C y administrados oralmente a lechones susceptibles de 3-5 días de edad.

Mientras que todas las inmunoglobulinas purificadas ensayadas eran capaces de proteger células *in vitro*, como se ha descrito anteriormente, únicamente la IgA-S purificada a partir de la leche obtenida en el día 1 post-parto tras estimulación en GALT (cerdas números 4 y 7) fue capaz de proteger el 100% de los lechones frente a la GPT. Por el contrario, todos los lechones inoculados con los inmunocomplejos de IgA-S obtenida de la leche del día 7 de la cerda número 7, que mostró un título similar de neutralización *in vitro* pero una especificidad distinta así como una menor afinidad, desarrollaron signos clínicos típicos de GPT. La IgA-S inducida en BALT, que también presentó diferencias en cuanto al reconocimiento de sitios antigénicos, una cinética de neutralización más lenta y menor afinidad por algunos epitopos del VGPT, fue capaz de proteger alrededor de un 30% de los lechones frente a la GPT, mientras que la IgG inducida en GALT, muy eficiente tanto en los ensayos de competición como en los de neutralización *in vitro*, protegió aproximadamente un 50% de los animales empleados (Fig. 24).

Adicionalmente, se realizaron estos mismos ensayos de protección *in vivo* de lechones (en colaboración con el Dr. Luis Enjuanes del CNB) empleando 3 AcMs específicos del sitio A, ICC12, IDE7 y 6AC3, específicos de los subsitios Aa, Ab y Ac, respectivamente, y capaces de neutralizar altos títulos de virus *in vitro* ($> 10^3$ PFU, ver Tabla I). Una mezcla de líquidos ascíticos a partes iguales de los tres AcMs se incubó con el virus, de igual forma que se realizaron los ensayos con las clases de Ig purificadas, y se administraron oralmente a lechones susceptibles. A pesar de que durante los dos primeros días de la experiencia los lechones recibieron los AcMs en el alimento, todos los lechones, menos uno, de los nueve ensayados presentaron signos clínicos durante la semana en que fueron observados, lo que supuso tan sólo un 11% de protección (Fig. 24).

ORIGEN	Clase Ig	Número de lechones contraprobados	Porcentaje lechones protegidos				
			0	25	50	75	100
Cerdas inmunizadas con VGPT							
Leche día 1 (cerda 4)	IgA	4					
Leche día 1 (cerda 7)	IgA	6					
Leche día 7 (cerda 7)	IgA	6					
Leche día 1 (cerda 7)	IgG	4	(50%)				
Cerdas inmunizadas con CVRP							
Leche día 1 (cerda 8)	IgA	6	(33%)				
AcMs(Aa,Ab,Ac)	IgG	9	(11%)				

Figura 24.- Porcentajes de protección conferida a lechones con las distintas clases de Ig purificadas. Las Igs (250 µg), incubadas con 10^3 PFU, fueron administradas a lechones susceptibles que contaban de 3 a 5 días de edad. Los porcentajes se calcularon como el cociente entre el número de lechones que no mostraron signos clínicos y el número total de lechones en cada ensayo x 100.

Aparentemente, los anticuerpos ingeridos por los lechones lactantes una semana tras el parto no son relevantes en la protección *in vivo* frente al VGPT, ya que la IgA purificada de la leche recogida el día 7 post-parto no resultó ser protectora. Para confirmar esta observación, se llevó a cabo un experimento de contraprueba de los lechones que sólo recibieron anticuerpos del calostro de una cerda inoculada con VGPT virulento. Esta cerda mostró en calostro un alto título de anticuerpos específicos del VGPT, que reconocían con alta afinidad los sitios antigénicos A y D (resultados no mostrados). Tras la exposición al virus virulento, todos los lechones, de 7 días de edad, mostraron signos clínicos leves típicos de la GPT pero fueron capaces de recuperarse y, por tanto, sobrevivieron a la contraprueba con una dosis letal de VGPT virulento, cepa MAD88.

DISCUSSION

En la primera parte del presente trabajo se ha analizado la repuesta inmunitaria, tanto sistémica como secretora, frente a las proteínas estructurales mayoritarias del VGPT en cerdas vacunadas con el VGPT o el antigénicamente relacionado CVRP. Las cerdas inmunizadas con ambos virus fueron capaces de conferir inmunidad lactogénica a sus lechones, como ya se ha descrito previamente por otros autores en cerdas natural o experimentalmente infectadas (Bohl, 1981; Bohl y Saif, 1975; Moxley y col., 1989; Bernard y col., 1989; Callebaut y col., 1990; Van Deun y col., 1990), oscilando, en nuestro caso, el nivel de protección en los dos grupos de cerdas vacunadas entre el 28,5 y el 100%. En los dos grupos de cerdas se observó, además, una correlación entre los niveles de anticuerpos neutralizantes en el calostro y la leche y la protección pasiva de los lechones lactantes.

En los estudios llevados a cabo con las cerdas vacunadas con el VGPT se seleccionaron, para la contraprueba con el VGPT virulento, los lechones nacidos de tres cerdas, una (cerda 4) representativa del grupo de cerdas que presentaron altos títulos de anticuerpos en suero y secreciones lácteas, y dos cerdas que presentaron los títulos más bajos (cerdas 6 y 7). De los lechones nacidos de la cerda 4 aproximadamente el 60% resultó protegido frente a la infección y tan solo 1 de los 18 lechones nacidos de las tres cerdas de este grupo murió a los dos días después de la exposición al virus virulento. Estos resultados confirman las observaciones previas de que cerdas vacunadas con VGPT virulento por vía oral confieren una buena protección lactogénica a sus lechones

(Bohl, 1981; Bohl y Saif, 1975; Moxley y col., 1989). Las condiciones de contrapueba fueron muy severas, ya que ningún lechón de los nacidos de la cerda control, no vacunada, fue capaz de sobrevivir a la misma.

La amplísima distribución del CVRP en la población porcina y la consecuente seroconversión, específica del CVRP, que ha tenido lugar de forma explosiva en Europa en los últimos años (Brown y Cartwright, 1986; Pensaert y col., 1986, 1992; Jestin y col., 1987; Madec y col., 1987; Henningsen y col., 1988; Bernard y col., 1989; Yus y col., 1989; Lanza y col., 1990) ha estado acompañada por una marcada reducción de los brotes de GPT, hecho que sugiere que ambos virus son capaces de inducir protección cruzada *in vivo*. Este fenómeno había sido previamente demostrado por distintos autores en cerdas infectadas con CVRP de forma natural (Bernard y col., 1989; Callebaut y col., 1990; Van Deun y col., 1990). En los estudios llevados a cabo con el CVRP en el presente trabajo, para los que se emplearon los lechones de las dos cerdas inmunizadas con dicho virus, hemos observado la existencia de protección cruzada entre el VGPT y el CVRP, con porcentajes de mortalidad en los lechones del 37,5 y el 71,5%. Los niveles de protección observados en esta experiencia son similares a los obtenidos por otros autores con cerdas de campo infectadas con el CVRP de forma natural.

Dado que el CVRP únicamente replica en el tracto respiratorio (Cox y col., 1990a) y puesto que las cerdas vacunadas con este virus secretaron anticuerpos específicos en el calostro y la leche, no se puede descartar la existencia en la cerda, como ya se ha descrito en ratones (McGhee y col., 1992), de un vínculo inmunológico entre el pulmón y las glándulas mamarias, similar al existente entre el intestino y la mama. Este vínculo, basándose en nuestros datos, parece ser menos eficiente que el vínculo intestino-mama, a juzgar por los menores títulos de anticuerpos secretores de las cerdas inmunizadas con el CVRP. Estos resultados parecen indicar, además, una respuesta inmunitaria preferencial sistémica, sobre todo en una de las cerdas, puesto que los anticuerpos presentes en la leche de ambas cerdas apenas son capaces de competir la unión de los AcMs, tanto específicos de la proteína S como de las proteínas N y M,

empleados en el estudio. No obstante, los menores niveles de anticuerpos secretores también podrían deberse a que la estimulación antigénica en pulmón (BALT) es menos eficiente que la que se produce con los mismos antígenos en el intestino (GALT), puesto que los títulos y niveles de competición de los anticuerpos sistémicos tampoco fueron muy elevados en las cerdas 8 y 9.

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue el de determinar cuáles de los sitios antigénicos de las proteínas estructurales del VGPT y CVRP son inmunogénicos en las cerdas vacunadas, especialmente en cuanto a anticuerpos secretores se refiere. Dado que la glicoproteína S ha sido identificada como la principal inductora de anticuerpos neutralizantes (Delmas y col., 1986; Garwes y col., 1978/1979; Jiménez y col., 1986), parece ser la principal candidata para una vacuna de subunidades efectiva frente a la GPT. La estructura antigénica de la proteína S, así como la del CVRP, muy estrechamente relacionado, ha sido bien estudiada (Correa y col., 1988; Delmas y col., 1986; Gebauer y col., 1991). El análisis de la estructura antigénica de esta proteína ha demostrado que su mitad amino-terminal es altamente inmunogénica y contiene los cuatro sitios antigénicos que han sido definidos para esta proteína (Correa y col., 1990; Delmas y col., 1990). El CVRP ha perdido los sitios antigénicos B y C pero los sitios A y D están presentes tanto en el virus de tropismo respiratorio como en el virus entérico. Ambos sitios, A y D, son capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes.

En este trabajo hemos encontrado diferencias en la inducción de anticuerpos secretores por los diferentes sitios antigénicos implicados en la neutralización del virus, siendo el más inmunogénico el sitio A. Dentro de éste, el subsitio Ab parece más antigénico que los subsitios Aa y Ac, independientemente de si la estimulación tuvo lugar en el tracto respiratorio o en el entérico.

Por el contrario, los sitios antigénicos B y C no parecen ser muy inmunodominantes, ya que los títulos de anticuerpos de las muestras de suero, calostro y leche obtenidas de las cerdas inmunizadas tanto con el VGPT como con el CVRP

fueron iguales empleando como antígeno ambos virus en la técnica ELISA. Esto se confirmó, al menos para el sitio B, por los bajos porcentajes de competición obtenidos frente al AcM 1DB12, específico de este sitio antigénico, con todas las muestras, así como con las clases de Ig purificadas del calostro y la leche de las cerdas inmunizadas con el VGPT. Por otro lado, en términos de protección los sitios B y C no parecen muy relevantes pues cerdas inmunizadas con el CVRP, carente de estos sitios antigénicos, protegieron en un cierto grado a los lechones.

En otro orden de cosas, la proteína S parece ser más antigénica que las proteínas N y M. No se puede descartar la posibilidad de que este resultado esté condicionado por los epítopos seleccionados para llevar a cabo el estudio, aunque esto parece poco probable ya que los epítopos analizados fueron altamente inmunogénicos en otros estudios (Correa y col., 1988). Sin embargo, otros autores (Henrickson y Portner, 1990) han descrito discrepancias en los niveles de antigenicidad de un determinado epítipo en diferentes especies. En lo que se refiere a la proteína S, este estudio valida, en cerdos, que son los huéspedes naturales del virus, los mapas antigénicos realizados con AcMs murinos, en los que el sitio A es considerado como el sitio inmunodominante (Correa y col., 1988; Delmas y col., 1986; Jiménez y col., 1986).

Una adecuada interpretación de los resultados obtenidos por medio del RIAC sobre la respuesta relativa en anticuerpos frente a los diferentes epítopos víricos, requiere que los AcMs empleados, que se unen a los diferentes sitios antigénicos, sean de la misma clase, así como que presenten afinidades relativas similares. Todos los AcMs empleados son de clase γ_1 con la excepción de los AcMs 1CC12 y 3DE3 que son de clase γ_{2a} y γ_{2b} , respectivamente. Las afinidades relativas de los AcMs se analizó por medio de un estudio de la unión al VGPT de cantidades idénticas de inmunoglobulina purificada, llevado a cabo mediante la técnica RIA. En dicho ensayo tanto el "plateau" (máxima unión) como los títulos de todos los AcMs resultaron ser muy similares (Enjuanes, resultados no publicados). Otros autores, llevando a cabo estudios similares en otros sistemas víricos, alcanzan conclusiones similares (Nowinski y col., 1979).

Los resultados obtenidos llevando a cabo IB y RIPA con los anticuerpos de las cerdas vacunadas mostraron que las tres proteínas estructurales son antigénicas durante la infección experimental. La cuantificación de la antigenicidad de estas proteínas no fue posible debido a las diferencias en reactividad observadas por las proteínas en las dos técnicas empleadas, probablemente a causa de la dependencia de conformación que presentan los epítomos en las proteínas. Los epítomos de la proteína N parecen exponerse tras desnaturalización con SDS y 2ME, puesto que los anticuerpos reaccionan más fuertemente frente a esta proteína en IB (epítomos lineales), en contraste con los epítomos de las proteínas M y S, que eran mejor reconocidos por los anticuerpos en RIPA (epítomos conformacionales).

Además de en el nivel de anticuerpos inducido por uno u otro virus, detectamos diferencias en el reconocimiento de epítomos víricos por los anticuerpos circulantes o secretores dependiendo del virus empleado en la inmunización. Los anticuerpos secretores obtenidos a partir de las cerdas inoculadas con el VGPT reconocieron mejor los epítomos específicos que los anticuerpos séricos, mientras que no se observaron diferencias notables entre los anticuerpos secretores y circulantes de las cerdas inmunizadas con el CVRP. En ambos casos la inducción de anticuerpos secretores por parte de los epítomos presentes en la proteína S parece tener importancia en los porcentajes de supervivencia de los lechones.

El sitio antigénico A en la proteína S fue altamente inmunogénico en cerdas vacunadas con VGPT, así como en cerdas vacunadas con el CVRP, y una buena respuesta inmunitaria de tipo secretor frente a este sitio se correlacionó bien con la inducción de protección pasiva. Basándonos en los datos obtenidos de esta primera parte del trabajo, podemos hipotetizar que una presentación adecuada al sistema inmune de las mucosas de las cerdas gestantes de uno o varios epítomos pertenecientes al sitio antigénico A proporcionaría una respuesta inmunitaria pasiva protectora a los lechones.

Además, este sitio antigénico está altamente conservado entre distintos aislados de VGPT y CVRP, así como entre coronavirus caninos y felinos (Sánchez y col., 1990).

Esto sugiere que los sitios que no están conservados entre los virus de esta familia son menos importantes inmunológicamente y podemos sugerir la existencia en este virus de una relación entre la conservación estructural y la respuesta inmunitaria, como se ha descrito para otros virus (Henrickson y Portner, 1990).

En la primera parte del trabajo se han estudiado los factores cuantitativos implicados en la transferencia de inmunidad, caracterizando la antigenicidad de los diferentes epítomos de las tres proteínas estructurales víricas. Sin embargo, en la protección pasiva frente al VGPT pueden estar jugando un papel importante, además de los mencionados factores otros de tipo cualitativo. Entre estos últimos, la clase de inmunoglobulina inducida por los diferentes epítomos relevantes previamente descritos, puede ser de gran importancia. Dado que la IgA parece ser la clase de inmunoglobulina más efectiva en la protección pasiva del neonato, uno de los objetivos primordiales de este trabajo ha sido el poder determinar cuáles de los sitios antigénicos conocidos de las glicoproteínas S del VGPT y del CVRP son los principales inductores de esta clase de inmunoglobulina en calostro y leche de cerdas gestantes.

Como ya se revisó en la introducción, y se ha discutido previamente, parece claro que ambos virus, cuyos determinantes antigénicos son prácticamente idénticos, son capaces de inducir protección cruzada *in vivo*. Bernard y col. (1989) observaron protección parcial frente al VGPT en camadas de cerdas que habían sido infectadas por CVRP de forma natural, aunque no estudiaron la clase de los anticuerpos presentes en las secreciones lácteas de estas cerdas. Callebaut y col. (1990) demostraron que cerdas inmunes tras una infección natural con CVRP secretan anticuerpos neutralizantes anti-VGPT en la leche aunque, sin embargo, estos anticuerpos no son siempre de la clase IgA. Sin embargo, Van Deun y col. (1990) observaron que cuando cerdas de campo que presentaban anticuerpos específicos del CVRP y que, por lo tanto, habían sufrido previamente una infección natural por CVRP, eran reinfectadas con dicho virus por vía oronasal durante las últimas semanas de la gestación o durante los primeros días de lactancia, se producía bien la inducción o bien el incremento de los títulos de IgA-S lactogénica específica del VGPT.

En este trabajo hemos demostrado que la vacunación experimental de cerdas gestantes con el VGPT o el antigénicamente relacionado CVRP, con diferente tropismo, resulta en respuestas inmunitarias tanto secretoras como circulantes. Tanto las cerdas inmunizadas con el VGPT como con el CVRP confieren inmunidad lactogénica a sus lechones frente a una infección por VGPT, aunque el nivel de protección en las cerdas estimuladas en BALT fue menor que en las cerdas estimuladas en GALT. Por lo tanto, queda todavía por determinar la causa de la diferente eficiencia con que las IgA-S inducidas por el VGPT y por el CVRP protegen a los lechones lactantes frente a la infección entérica por el VGPT. Ambos virus presentan sitios antigénicos comunes implicados en la neutralización (sitios A y D de la glicoproteína S) (Sánchez y col., 1990), pero su distinto tropismo condiciona la estimulación de compartimentos diferentes del sistema inmune de las mucosas (BALT o GALT), ambos teóricamente conectados con la glándula mamaria (McGhee y col., 1992), como ya se ha discutido. Por ello, en la segunda parte del presente trabajo se han analizado las diferencias entre las respuestas inmunitarias secretoras frente a los epítomos del VGPT implicados en neutralización en cerdas gestantes tras la estimulación en GALT o BALT por los virus VGPT y CVRP respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran diferencias en la inducción de las distintas clases de inmunoglobulina secretoras por los diferentes sitios antigénicos, siendo los sitios A y D los mejores inductores de IgA-S, en ambos grupos de cerdas. No obstante, se han encontrado diferencias condicionadas por el diferente tropismo de ambos virus, VGPT y CVRP. Cuando la replicación vírica tiene lugar en la mucosa intestinal y, por lo tanto, la estimulación ocurre en el GALT, todos los subsitios del sitio antigénico A estimulan la producción y secreción de cantidades similares de IgA-S en la leche. Cuando la estimulación tiene lugar en el BALT por la replicación del CVRP en el pulmón, el subsitio antigénico Ab es el mejor inductor de esta clase de inmunoglobulina en leche. En ambos tipos de estimulación el sitio D es un buen inductor de IgA-S.

Para poder investigar en mayor profundidad otros factores, además del reconocimiento epitópico, que pudieran estar influenciando la protección pasiva de los

lechones, estudiamos las características de las inmunoglobulinas purificadas de leche en cuanto a su afinidad por dichos epítomos y a su capacidad neutralizante tanto *in vitro* como *in vivo*. Para las experiencias de protección *in vivo* se seleccionó la leche del primer día como fuente de Ig y no el calostro ya que un alto porcentaje de los anticuerpos presentes en el calostro son de origen sérico mientras que la leche está enriquecida en anticuerpos producidos localmente, principalmente de la clase IgA-S (Bourne y Curtis, 1973; Dahlgren y col., 1989).

La IgA-S purificada a partir de la leche recogida el día 1 después del parto de las cerdas estimuladas en GALT por el VGPT, que reconoce fundamentalmente los sitios A y D con alta afinidad, fue capaz de proteger al 100% de los lechones empleados en las experiencias de protección *in vivo*. Por el contrario, la IgA-S purificada a partir de la leche recogida el día 7 post-parto de estas mismas cerdas, que reconoce principalmente el sitio A y muestra una baja afinidad por el sitio D, no fue capaz de proteger a ningún lechón en los experimentos de protección *in vivo*. El reconocimiento de un solo sitio antigénico del virus (sitio A) por IgA-S neutralizante obtenida de la leche del día 7 podría ser la causa de que estos anticuerpos presenten una cinética de neutralización más lenta. Sin embargo, la IgA-S de la leche recogida el día 7 también mostró una menor afinidad por el sitio A que la que presentó la IgA-S obtenida el día 1 después del parto, lo que podría explicar tanto el retraso en la neutralización del virus como la reversibilidad de esta por dilución de los complejos virus-anticuerpo. Esto concuerda con la observación de que también la IgA-S purificada a partir de la leche de las cerdas estimuladas en BALT por el CVRP presentó una cinética de neutralización más lenta. Esta IgA, mientras que se comportó de forma idéntica en cuanto a la neutralización *in vitro*, se diferenció claramente de la IgA-S inducida en el GALT en lo que concierne a las características de reconocimiento antigénico y afinidad. La IgA purificada de la leche de la cerda inoculada con el CVRP presentó una alta afinidad por el sitio D mientras que requirió un ensayo de competición en 2 pasos para bloquear significativamente la unión de al menos un AcM específico del sitio A. Es interesante notar que el porcentaje de protección *in vivo* para esta IgA purificada fue tan sólo del 30% de lechones protegidos.

Estos datos podrían sugerir que ambos sitios antigénicos (A y D) pueden jugar un papel importante en la respuesta inmunitaria lactogénica protectora frente al VGPT. Los resultados obtenidos parecen indicar que la inducción de IgA-S en leche por ambos sitios antigénicos es necesaria para la protección *in vivo*, mientras que para la protección *in vitro* únicamente se requeriría la unión de los anticuerpos a uno sólo de ellos.

Este requisito de que los anticuerpos se unan a más de un sitio antigénico implicado en la neutralización del virus para la protección lactogénica de los cerdos neonatos concuerda con los resultados obtenidos por Wesley y col. (1988) que no obtuvieron protección de lechones *in vivo* cuando empleaban 2 AcMs específicos de las glicoproteínas S y M bien independientemente o en combinación. En este trabajo hemos confirmado este fenómeno mediante el empleo, en una experiencia similar de protección *in vivo*, de una mezcla de los tres AcMs específicos del sitio A, cada uno específico de un subsitio antigénico. Todos los lechones en la experiencia, menos uno, mostraron signos clínicos típicos de la GPT.

Con estas experiencias hemos podido corroborar el descenso en el título de anticuerpos específicos frente al virus en la leche a lo largo de la lactancia (Bourne y Curtis, 1973; Newby y col., 1982) puesto que la leche recogida de las cerdas inmunizadas con el VGPT una semana después del parto presentó un título de anticuerpos y niveles de competición mucho más bajos que el calostro o la leche del primer día. Estos anticuerpos recogidos de la leche del día de la contraprueba, principalmente de clase IgA-S, presentaron, además, una afinidad disminuida con respecto a la leche del día 1 post-parto frente a los epítomos relevantes de la proteína S, una cinética de neutralización *in vitro* más lenta y no fueron capaces de proteger a los lechones en los experimentos de protección *in vivo*. Sin embargo, los lechones nacidos de cerdas vacunadas con el VGPT resultaron protegidos frente a la contraprueba con virus virulento en el momento en que estaban ingiriendo IgA no protectora (7 días después del parto). Esto podría explicarse porque la IgA-S ingerida durante los 1-3 primeros días de lactancia tiene una alta afinidad por la mucosa intestinal y queda unida a esta, permaneciendo activa durante periodos largos de tiempo (Butler y col., 1981).

Hemos puesto de manifiesto la relevancia de los anticuerpos calostrales en la protección frente al VGPT mediante la contraprueba de los lechones que fueron retirados de la madre, inmunizada con el VGPT, al día siguiente del parto de modo que sólo ingirieron este tipo de anticuerpos. Dichos lechones sobrevivieron a la exposición oral al VGPT virulento 7 días después del nacimiento. Por tanto, estos lechones poseían una defensa humoral suficiente, obtenida del calostro, para estar protegidos al menos 6 días después de la última ingestión de leche hiperinmune.

En este estudio no sólo estábamos interesados en la inducción de IgA-S, sino también en la inducción selectiva por los epítomos del VGPT de otras clases y subclases de Ig, principalmente IgG, que está presente en el calostro y la leche durante los primeros días de la lactancia en altas concentraciones (el calostro y la leche temprana contienen más IgG que IgA en términos absolutos), por lo que no puede descartarse su papel en protección. Otros autores han mostrado que IgG purificada a partir del calostro, que mostraba una alta afinidad y una elevada capacidad neutralizante, era capaz de proteger a lechones frente a una contraprueba con VGPT virulento (Stone y col., 1977). Nuestros resultados concuerdan con estas observaciones y sugieren que la IgG puede desempeñar un papel importante en la inmunidad lactogénica.

En el cerdo no se produce transferencia transplacentaria de inmunoglobulinas, y, como ya se ha revisado, el calostro y la leche son las principales vías por las que el cerdo neonato adquiere inmunidad pasiva. En el calostro de la cerda la IgG está presente en altas concentraciones, y esta IgG proviene en gran medida del suero por una concentración selectiva de esta clase de inmunoglobulina que tiene lugar en la glándula mamaria (Bourne y Curtis, 1973). Ya que la mayoría de la proteína en el calostro es absorbida sin degradar en el intestino del cerdo recién nacido, esta concentración selectiva de IgG sérica en el calostro parece constituir un mecanismo por el cual los anticuerpos séricos de la madre son transferidos a la circulación del lechón tras el nacimiento (Newby y col., 1982). Estos anticuerpos permanecen, con una vida media para la IgG de 12-14 días, hasta que el sistema inmunitario del lechón está completamente maduro, lo que no ocurre hasta al menos 16 semanas después del

nacimiento (Curtis y Bourne, 1971). Los elevados porcentajes de competición obtenidos en los ensayos de RIAC realizados con los sueros de los lechones recogidos el día de la contraprueba, cuando contaban 7 días de edad, confirman este hecho y muestran que dicha absorción en el intestino es altamente eficiente, puesto que se corresponden al patrón de porcentajes de competición mostrado por los anticuerpos secretores tempranos de la madre. Los títulos de anticuerpos de los sueros de los lechones recogidos una semana después de la contraprueba (14 días post-parto) fueron muy similares a los de la primera toma de sangre (7 días post-parto).

La IgG aislada de la leche del día 1 tras la estimulación en GALT, que mostraba títulos altos de neutralización *in vitro* y una alta afinidad por los sitios antigénicos A y D del VGPT, fue capaz de proteger un alto porcentaje de lechones frente a la GPT (alrededor del 50%). El menor porcentaje de protección mostrado por la IgG con relación a la IgA podría estar debido a su menor resistencia a la digestión enzimática.

Así como para otros sistemas, como ciertos parásitos (Gasbarre y col., 1989) y otros virus, como el HIV (Mathiesen y col., 1989), se ha descrito una respuesta predominantemente de tipo IgG₂ o IgG₁, nosotros no observamos una inducción preferencial significativa de ninguna de las subclases de IgG por parte de ningún epítipo ya que obteníamos porcentajes de competición, y de neutralización, similares con IgG₁ e IgG₂ lactogénicas de cerdas estimuladas tanto en GALT como en BALT. Tan sólo la IgG₁ presentaba porcentajes de competición y títulos de neutralización ligeramente más altos que la IgG₂, y no en todos los casos.

Por lo tanto, la IgA-S es, como ya ha sido previamente descrito (Bohl, 1981; McGhee y col., 1992; Moxley y col., 1989; Saif y Bohl, 1979), la clase de inmunoglobulina más importante en la protección pasiva de los cerdos neonatos durante los 7 primeros días de vida. Nuestros resultados sugieren que para que la IgA-S sea eficaz en la protección *in vivo* frente al VGPT debe reconocer por igual a los dos sitios antigénicos inmunodominantes en el virus, sitios A y D, de la glicoproteína S con alta afinidad. Esto debería tenerse en cuenta para el diseño de una vacuna por subunidades

eficiente frente al VGPT o para la obtención de cerdas transgénicas que produzcan Igs específicas frente al virus de forma constitutiva en secreciones lácteas.

CONCLUSIONES

- 1.- La inoculación experimental de cerdas gestantes con VGPT y CVRP ha permitido demostrar la existencia de un vínculo inmunológico intestino-mama y pulmón-mama, dado que tras la infección con ambos virus se detectaron anticuerpos específicos en las secreciones lácteas. No obstante, la estimulación en BALT parece ser menos eficiente que la estimulación en GALT, puesto que la respuesta inmunitaria en cerdas inoculadas con el CVRP fue cuantitativamente menor y el nivel de protección pasiva proporcionada por estas cerdas a sus lechones fue también inferior al proporcionado por las cerdas inmunizadas con el VGPT.
- 2.- La glicoproteína S fue más antigénica que las proteínas N y M en cerdas gestantes vacunadas tanto con el VGPT como con el CVRP. El sitio antigénico A de la glicoproteína S, especialmente el subsitio Ab, fue el inmunodominante en cerdas gestantes inoculadas con ambos virus, seguido por el sitio antigénico D. Una buena respuesta secretora en cerdas frente a estos sitios antigénicos se correlacionó bien con la inducción de protección pasiva de sus lechones lactantes.
- 3.- Los sitios antigénicos A y D de la glicoproteína S son los mejores inductores de IgA-S, tanto si la presentación antigénica se realizó en GALT o en BALT por el VGPT o el CVRP, respectivamente. Todos los subsitios del sitio antigénico A indujeron IgA-S de forma similar cuando se inmunizó con el VGPT, mientras que el subsitio Ab fue el mejor inductor de IgA-S cuando la inmunización se realizó con el CVRP, sin que en ninguno de los dos casos se produjera una inducción preferencial de esta clase de inmunoglobulina.

- 4.- La combinación de los resultados de experimentos de reconocimiento de epítomos y afinidad por los mismos por parte de IgA-S de distinta procedencia y nivel de protección pasiva permite concluir que para que anticuerpos de esta clase sean protectores *in vivo* deben reconocer y mostrar una elevada afinidad por al menos los sitios antigénicos A y D de la glicoproteína S, mientras que para la protección *in vitro* el reconocimiento de uno solo de estos sitios antigénicos es suficiente. Una respuesta inmunitaria de estas características se induce más eficientemente cuando la presentación antigénica tiene lugar en GALT en lugar de en BALT.

BIBLIOGRAFIA

Abou-Youssef, M.H. and Ristic, M. (1972). Distribution of antibodies to transmissible gastroenteritis virus in serum and milk of sows: isolation and identification of the immunoglobulin classes of swine serum and milk. *Am. J. Vet. Res.*, **33**: 975-979.

Abou-Youssef, M.H. and Ristic, M. (1975). Protective effect of immunoglobulins in serum and milk of sows exposed to transmissible gastroenteritis virus. *Can. J. Comp. Med.*, **39**: 41-45.

Alcaraz, C., de Diego, M., Pastor, M.J. and Escribano, J.M. (1990). Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**: 191-196.

Alcaraz, C., Pasamontes, B., Ruiz-Gonzalvo, F. and Escribano, J.M. (1989). African swine fever virus-induced proteins on the plasma membranes of infected cells. *Virology*, **168**: 406-408.

Alonso, J.M.M., Balbin, M., Garwes, D.J., Enjuanes, L., Gascon, S. and Parra, F. (1992). Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *Virology*, **188**: 168-174.

Armstrong, J., Smeekens, S. and Rottier, P. (1983). Sequence of the nucleocapsid gene from murine coronavirus MHV-A59. *Nucleic Acid Research*, **11**: 883-891.

Aynaud, J.M., Nguyen, T.D., Bottreau, E., Brun, A., Bernard, S. and Vannier, Ph. (1986). Transmissible gastroenteritis: induction of a protective lactogenic immunity in the sow using the 188-SG strain of TGE virus (Nouzilly strain). Proc. 9th IPVS Congress, Barcelona, (España).

Bachmann, P.A. (1979). Pathogenic features of intestinal coronavirus infections. En: "Mechanisms of viral pathogenesis and virulence". Bachmann, P.A. (ed.). Proc. 4th Munich Symposium on Microbiology, pp. 217-227.

Bae, I., Jackwood, D., Benfield, D., Saif, L.J., Wesley, R.D. and Hill, H.T. (1991). Differentiation of transmissible gastroenteritis virus from porcine respiratory coronavirus and other antigenically related coronaviruses by using cDNA probes specific for the 5' region of the S glycoprotein gene. J. Clin. Microbiol., **29**: 215-218.

Baric, R.S., Shieh, CH.K., Stohlman, S.A. and Lai, M.M.C. (1987). Studies into the mechanism of MHV transcription. Adv. Exp. Med. Biol., **218**: 137-149.

Beagley, K.W., Eldridge, J.H., Kiyono, H., Everson, M.P., Koopman, W.J., Honjo, T. and McGhee, J.R. (1988). Recombinant murine IL-5 induced high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer's patch B cells. J. Immunol., **141**: 2035.

Beagley, K.W., Eldridge, J.H., Lee, F., Kiyono, H., Everson, M.P., Koopman, W.J. et al. (1989). Interleukins and IgA synthesis: human and murine IL-6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. J. Exp. Med., **169**: 2133.

Bereiter, M., Hasler, J. and Keller, H. (1988). Transmissible gastroenteritis (TGE) in der schweiz: antikörperpersistenz nach infektion und seroepidemiologische untersuchungen zur bedeutung des TGE-virus als durchfallerreger. Schw. Arch. Tierh., **130**: 237-248.

Bernard, S., Bottreau, E., Aynaud, J.M., Have, P. and Szymansky, J. (1989). Natural infection with the porcine respiratory coronavirus induces protective lactogenic immunity against transmissible gastroenteritis. Vet. Microbiol., **21**: 1-8.

Bernard, S., Shirai, J., Lantier, I., Bottreau, E., Aynaoud, J.M. (1990). Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis (TGE) of swine induced by the attenuated Nouzilly strain of TGE virus: passive protection of piglets and detection of serum and milk antibody classes by ELISA. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **24**: 37-47.

Bienenstock, J. (1980). Bronchus-associated lymphoid tissue. En: "Immunology of the lung and upper respiratory tract". Bienenstock, J. (ed.) McGraw-Hill, New York, NY., (EE.UU.), p.: 96.

Bierer, B.E., Sleckman, B.P., Ratnofsky, S.E. and Burakoff, S.J. (1989). The biologic roles of CD2, CD4 and CD8 in T-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.*, **7**: 579.

Bohl, E.H. (1972). Antibody in serum, colostrum and milk of swine after infection or vaccination with transmissible gastroenteritis virus. *Infect. Immun.*, **6**: 289-301.

Bohl, E.H. (1981). Transmissible gastroenteritis. En: "Disease of swine". Leman, A.D., Glock, R.D., Mengeling, W.L., Penny, R.H.C., Scholl, E. and Straw, B. (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, (EE.UU.), pp. 195-208.

Bohl, E.H., Frederick, G.T. and Saif, L.J. (1975). Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: intramuscular injection of pregnant swine with a modified live-virus vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, **36**: 267-271.

Bohl, E.H. and Kumagai, T. (1965). The use of cell cultures for the study of transmissible gastroenteritis virus of swine. En: "Proceedings, 69th Annu. Meeting, U.S. Livestock Sanit. Assoc", pp. 343-350.

Bohl, E.H. and Saif, L.J. (1975). Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infect. Immun.*, **11**: 23-32.

Bonner, W.M. and Laskey, R.A. (1974). A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.*, **46**: 83-88.

Bourne, F.J. and Curtis, J. (1973). The transfer of immunoglobulins IgG, IgA and IgM from serum to colostrum and milk in the sow. *Immunol.*, **24**: 157-162.

Bourne, F.J., Newby, T.J. and Chidlow, J.W. (1975). The influence of route of vaccination on the systemic and local immune response in the pig. *Res. Vet. Sci.*, **18**: 244-248.

Bournsnel, M.E.G., Brown, T.D.K., Foulds, I.J., Green, P.F., Tomley, F.M. and Binns, M.M. (1987). Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen. Virol.*, **68**: 57-77.

Boyle, J.F., Weismiller, D.G. and Holmes, K.V. (1987). Genetic resistance to mouse hepatitis virus correlates with absence of virus-binding activity on target tissues. *J. Virol.*, **61**: 185-189.

Brian, D.A., Dennis, D.E. and Guy, J.S. (1980). Genome of porcine transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.*, **34**: 410-415.

Britton, P., Cármenes, R.S., Page, K.W., Garwes, D.J. and Parra, F. (1988). Sequence of the nucleoprotein gene from a virulent British field isolate of transmissible gastroenteritis virus and its expression in *Sacharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **2**: 89-99.

Britton, P., Mawditt, M.L. and Page, K.W. (1991). The cloning and sequencing of the virion protein genes from a British isolate of porcine respiratory coronavirus: comparison with transmissible gastroenteritis virus genes. *Virus Res.*, **21**: 181-198.

Brown, I. and Cartwright, S.F. (1986). New porcine coronavirus?. *Vet. Rec.*, **119**: 282-283.

Budzilowicz, C.J. and Weiss, S.R. (1987). In vitro synthesis of two polypeptides from a nonstructural gene of coronavirus mouse hepatitis virus strain A59. *Virology*, **157**: 509-515.

Bullido, M.J., Correa, I., Jiménez, G., Suñé, C., Gebauer, F. and Enjuanes, L. (1989). Induction of transmissible gastroenteritis coronavirus-neutralizing antibodies in vitro by virus-specific T-helper cell hybridomas. *J. Gen. Virol.*, **70**: 659-672.

Butler, J.E., Klobasa, F. and Werhahn, E. (1981). The differential localization of IgA, IgM and IgG in the gut of suckled neonatal piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **2**: 53-65.

Callebaut, P., Correa I., Pensaert, M., Jiménez, G. and Enjuanes, L. (1988a). Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.*, **69**: 1725-1730.

Callebaut, P., Cox, E., Pensaert, M.B. and Van Deun, K. (1990). Induction of milk IgA antibodies by porcine respiratory coronavirus infection. En: "Coronaviruses and their diseases". Cavanagh, D. y Brown, D. (eds.).

Callebaut, P., Pensaert, M.B. and Hooybergs, J. (1988b). A blocking ELISA for the differentiation of pigs infected with TGEV or with the TGEV-related respiratory coronavirus. *Proc. 10th IPVS Congress, Río de Janeiro, (Brasil)*, p. 199.

Callebaut, P., Pensaert, M.B. and Hooybergs, J. (1989). A competitive inhibition ELISA for the differentiation of serum antibodies from pigs infected with TGEV or with the TGEV-related PRCV. *Vet. Microbiol.*, **20**: 9-19.

Coffman, R.L., Lebman, D.A. and Shrader, B. (1989). Transforming growth factor β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **170**: 1039.

Compton, S.R., Rogers, D.B., Holmes, K.V., Fertsch, D., Remenik, J. and McGowan, J.J. (1987). In vitro replication of mouse hepatitis virus strain A59. *J. Virol.*, **61**: 1814-1820.

Concellón Martínez, A. (1960). Gastroenteritis epizootica transmissible de los cerdos. *Bol. Inf. Consejo Gen. Col. Vet. Esp.*, **7**: 479-483.

Cornelius, L.M., Hooper, B.E. and Haelterman, E.O. (1968). Changes in fluid and electrolyte balance in baby pigs with transmissible gastroenteritis. *Am. J. Clin. Pathol.*, **2**: 105-113.

Correa, I., Gebauer, F., Bullido, M.J., Suñé, C., Baay, M.F.D., Zwaagstra, K.A., Posthumus, W.P.A., Lenstra, J.A. and Enjuanes, L. (1990). Localization of antigenic sites of the E2 glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.*, **71**: 271-279.

Correa, I., Jiménez, G., Suñé, C., Bullido, M.J. and Enjuanes, L. (1988). Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Research*, **10**: 77-94.

Cox, E., Hooybergs, J. and Pensaert, M.B. (1990a). Sites of replication of a porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus. *Res. Vet. Sci.*, **48**: 165-169.

Cox, E., Pensaert, M.B. and Callebaut, P. (1993). Intestinal protection against challenge with transmissible gastroenteritis virus of pigs immune after infection with the porcine respiratory coronavirus. *Vaccine*, **11**: 267-272.

Cox, E., M. B. Pensaert, P. Callebaut, and K. Van Deun. (1990b). Intestinal replication of a respiratory coronavirus closely related antigenically to the enteric transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.*, **23**: 237-243.

Curtis, J. and Bourne, F.J. (1971). Immunoglobulin quantitation in sow serum, colostrum and milk and the serum of young pigs. *Biochim. Biophys. Acta*, **236**: 319-322.

Charley, B. and Laude, H. (1988). Induction of alpha interferon by transmissible gastroenteritis coronavirus: role of transmembrane protein E1. *J. Virol.*, **62**: 8-11.

Dahlgren, U., Carlsson, B., Jalil, F., MacDonald, R., Mascart-Lemone, F., Nilsson, K., Robertson, D., Sennhauser, F., Wold, A. and Hanson, L.Å. (1989). Induction of the mucosal immune response. *Curr. Top. Microb. Immunol.*, **146**: 155-160.

De Diego, M., Laviada, M.D., Enjuanes, L. and Escibano, J.M. (1992a). Epitope specificity of protective lactogenic immunity against swine transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.*, **66**: 6502-6508.

De Diego, M., Laviada, M.D. y Escibano, J.M. (1992b). Inmunidad frente al virus de la GPT. *PORCI*, **10**: 37-53

De Groot, R.J., Luytjes, W., Horzinek, M.C., Van der Zeijst, B.A.M. and Spaan, W.J.M. (1987a). Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. *J. Mol. Biol.*, **196**: 963-966.

De Groot, R.J., Maduro, J., Lenstra, J.A., Horzinek, M.C., Van der Zeijst, B.A.M. and Spaan, W.J.M. (1987). cDNA cloning and sequence analysis of the gene encoding the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus. *J. Gen. Virol.*, **68**: 2639-2646.

Delmas, B., Gelfi, J. and Laude, H. (1986). Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. II. Domains in the peplomer glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, **67**: 1405-1418.

Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.H., Sjöström, H., Noren, O. and Laude, H. (1992). Amino-peptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, **357**: 417-420.

Delmas, B. and Laude, H. (1990). Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression. *L. Virol.*, **64**: 5367-5373.

Delmas, B., Rasschaert, D., Godet, M., Gelfi, J. and Laude, H. (1990). Four major antigenic sites of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus are located on the amino-terminal half of spike protein. *J. Gen. Virol.*, **71**: 1313-1323.

Dennis, D.E. and Brian, D.A. (1982). RNA-dependent RNA polymerase activity in coronavirus-infected cells. *J. Virol.*, **42**: 153-164.

Djurickovic, S. and Thorsen, J. (1970). Experimental immunisation of sows against transmissible gastroenteritis. *Vet. Rec.*, **87**: 62-64.

Doyle, L.P. and Hutchings, L.M. (1946). A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Am. Vet. Assoc.*, **108**: 257-259.

Duijvestijn, A. and Hamann, A. (1989). Mechanisms and regulation of lymphocyte migration. *Immunol. Today*, **10**: 23-28.

Dulbecco, R and Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyomavirus. *Virology*, **8**: 396-401.

Duret, C., Brun, A., Guilmoto, H. et Dauvergne, M. (1988). Isolement, identification et pouvoir pathogene chez le porc d'un coronavirus apparenté au virus de la gastro-enterité transmissible. *Rec. Méd. Vét.*, **164**: 221-226.

Egan, L.T., Harris, D.L. and Hill, H.T. (1982). Prevalence of swine dysentery, transmissible gastroenteritis and pseudorabies in Iowa, Illinois and Missouri swine. *Proc. 86th Ann. Meet. U.S. Anim. Health Assoc.*, pp. 497-502.

Elson, C.O., Heck, J.A. and Strober, W. (1979). T-cell regulation of murine IgA synthesis. *J. Exp. Med.*, **149**: 632.

Enjuanes, L., and B. A. M. Van der Zeijst. (1992). Molecular basis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) epidemiology. En: "Coronaviruses". S. G. Siddell (ed.). Plenum Press, New York (EE.UU.).

Ernst, P.B., Maeba, J., Lee, S.I. and Paraskevas, F. (1988). A novel mechanism for the selection of isotype-specific antibody responses: the role of intestinal T cells in the regulation of IgA synthesis by the anti-suppressor circuit. *Immunol.*, **65**: 59-66.

Escribano, J.M. (1991). Inmunidad de mucosas. *PORCI*, **2**: 65-72.

Escribano, J.M. and Tabarés, E. (1987). Proteins specified by African swine fever virus: V-Identification of immediate early, early and late proteins. *Arch. Virol.*, **92**: 221-232.

Ferris, D.H. (1973). Epizootiology of porcine transmissible gastroenteritis (TGE). *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, **17**: 57-86.

Frederick, G.T. and Bohl, E.H. (1976). Local and systemic cell-mediated immunity against transmissible gastroenteritis, an intestinal viral infection of swine. *J. Immunol.*, **116**: 1000-1004.

Gagnon, A.N., Dulac, G.C., Marsolais, G., Lussier, G. et Marois, P. (1974). Maladies porcines a étiologie virale dans la Province Quebec. II. Gastro-entérite transmissible. *Can. Vet. J.*, **15**: 316-318.

Garwes, D.J., Lucas, M.H., Higgins, D.A., Pike, B.V. and Cartwright, S.F. (1978/1979). Antigenicity of structural components from porcine transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.*, **3**: 179-190.

Garwes, D.J., Stewart, F. and Britton, P. (1989). The polypeptide of M_r 14000 of porcine transmissible gastroenteritis virus: gene assignment and intracellular location. *J. Gen. Virol.*, **70**: 2495-2499.

Garwes, D.J., Stewart, F., Cartwright, S.F. and Brown, I. (1988). Differentiation of porcine respiratory coronavirus from transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Rec.*, **126**: 573-576.

Gasbarre, L. C., and A. Canals. (1989). Induction of protective immunity in calves immunized with adult *Oesophagostomum radiatum* somatic antigens. *Vet. Parasitol.*, **34**: 223-238.

Gebauer, F., Correa, I., Sánchez, C. y Enjuanes, L. (1990). Relevancia biológica de mutaciones puntuales en la proteína del peplómero del coronavirus de la gastroenteritis porcina transmissible. *Proc. II Congreso Nacional de Virología, Valladolid, (España)*, p. 136.

Gebauer, F., Posthumus, W.P.A., Correa, I., Suñé, C., Smerdou, C., Sánchez, C.M., Lenstra, J.A., Melen, R.H. and Enjuanes, L. (1991). Residues involved in the antigenic sites of transmissible gastroenteritis coronavirus S glycoprotein. *Virology*, **183**: 225-238.

Godet, M., L'Haridon, R., Vautherot, J.F. and Laude H. (1992). TGEV coronavirus ORF4 encodes a membrane protein that is incorporated into virions. *Virology*, **188**: 666-675.

Goodwin, R.F.W. and Jennings, A.R. (1958). A highly infectious gastroenteritis of pigs. *Vet. Rec.*, **70**: 271-272.

Gough, P.M., Ellis, C.H., Frank, C.J. and Johnson, C.J. (1983). A viral subunit immunogen for porcine transmissible gastroenteritis. *Antiviral Res.*, **3**: 211-221.

Gough, P.M., Frank, C.J., Moore, D.G., Sagona, M.A. and Johnson, C.J. (1983). Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis virus induced by a subunit immunogen. *Vaccine*, **1**: 37-41.

Haelterman, E.D. (1962). Epidemiological studies of transmissible gastroenteritis of swine. *Proc. 66th Ann. Meet. U.S. Livestock Sanit. Assoc.*, pp. **305-315**.

Haelterman, E.O. (1965). Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **147**: 1661.

Haelterman, E.D. (1972). On the pathogenesis of TGE of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **160**: 534-540.

Harada, K., Furuuchi, S., Kumagai, T. and Sasahara, J. (1969). Pathogenicity, immunogenicity and distribution of transmissible gastroenteritis virus in pigs. *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, **9**: 185-192.

Henning, E.R. and Thomas, P.C. (1981). Comparison of intramuscular and oral modified-live virus TGE vaccines. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, **76**: 1789-1792.

Henningsen, A., Mousing, J., Aalund, O. (1988). Porcine corona virus (PCV) i Danmark. En epidemiologisk tvaersnitanalyse baseret pa screening-omrade sp rgeskema data. *Dansk VetTidsskr.*, **71**: 1168-1177.

Henrickson, K.J. and Portner, A. (1990). Antibody response in children to antigen sites on human PIV-3 HN: correlation with known epitopes mapped by monoclonal antibodies. *Vaccine*, **8**: 75-80.

Heyworth, M.F. and Jones, A.L. (eds.) (1988). "Immunology of the gastrointestinal tract and liver". Raven Press, Ltd., New York, (EE.UU.).

Hohdatsu, T., Okada, S. and Koyama, H. (1991). Characterization of monoclonal antibodies against feline infectious peritonitis virus type II and antigenic relationship between feline, porcine and canine coronaviruses. *Arch. Virol.*, **117**: 85-95.

Hooper, B.E. and Haelterman, E.O. (1966). Concepts of pathogenesis and passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **149**: 1580-1586.

Hooybergs, J., Pensaert, M.B. and Callebaut, P. (1988). Transmissible gastroenteritis: outbreaks in swine herds previously infected with a TGEV-like porcine respiratory coronavirus. *Proc. 10th IPVS Congress. Rio de Janeiro, (Brasil)*, p. 200.

Hsiung, G.D. and Fong, C.K. (1982). "Diagnostic Virology". Yale University Press. New Haven and London.

Hu, S., Bruszewski, J., Boone, T. and Souza, L. (1984). Cloning and expression of the surface glycoprotein gp195 of porcine transmissible gastroenteritis virus. En: "Modern approaches to vaccines". Chanock, R.M. and Lerner, R.A. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, (EE.UU.), pp. 219-223.

Jackwood, D.J., Bae, I., Jackwood, R.J. and Saif, L.J. (1992). Transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus: molecular characterization of the S gene using cDNA probes and nucleotide sequence analysis. En: "Coronaviruses: Molecular Biology and Virus-Host Interactions". Laude, H. and Vautherot, J.F. (eds.). Plenum Press, New York, NY, (EE.UU.).

Jacobs, L., de Groot, R.J., Van der Zeijst, B.A.M., Horzinek, M.C. and Spaan, W.J. (1987). The nucleotide sequence of the peplomer gene of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV): comparison with the sequence of the peplomer protein of feline infectious peritonitis virus (FIPV). *Virus Research*, **8**: 363-371.

Jacobs, L., Van der Zeijst, B.A.M. and Horzinek, M.C. (1986). Characterization and translation of transmissible gastroenteritis virus mRNAs. *J. Virol.*, **57**: 1010-1015.

Jestin, A., Le Forban, Y. et Vannier, P. (1987a). Apparition et prévalence d'un nouveau coronavirus dans les élevages porcins français. *Journées Rech. Porcine en France*, **19**: 167-172.

Jestin, A., Le Forban, Y., Vannier, P., Madec, F. et Gourreau, J. (1987b). Un nouveau coronavirus porcin. Etude séro-épidémiologiques rétrospectives dans les élevages de Bretagne. *Rec. Méd. Vét.*, **163**: 567-571.

Jiménez, G., Correa, I., Melgosa, M.P., Bullido, M.J. and Enjuanes, L. (1986). Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.*, **60**: 131-139.

Kantak, A.G. and Cooperstock, M.S. (1991). Fetal intestinal transplant model for mucosal immune responses. *J. Immunol. Meth.*, **138**: 191-199.

Kapke, P.A. and Brian, D.A. (1986). Sequence analysis of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus nucleocapsid protein gene. *Virology*, **151**: 41-49.

Kapke, P.A., Tung, F.Y., Brian, D.A., Woods, R.D. and Wesley, R.D. (1987). Nucleotide sequence of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus matrix protein gene. *Adv. Exp. Biol. Med.*, **218**: 117-122.

Kapke, P.A., Tung, F.Y., Hogue, B.G., Brian, D.A., Woods, R.D. and Wesley, R.D. (1988). The amino-terminal signal peptide on the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus matrix protein is not an absolute requirement for membrane translocation and glycosylation. *Virology*, **165**: 367-376.

Kawanishi, H., Saltzman, L.E. and Strober, W. (1982). Characteristics and regulatory function of murine Con A-induced, cloned T cells obtained from Peyer's patches and spleen: mechanisms regulating isotype-specific immunoglobulin production by Peyer's patch B cells. *J. Immunol.*, **129**: 475.

Kawanishi, H., Saltzman, L.E. and Strober, W. (1983). Mechanisms regulating IgA class-specific immunoglobulin production in murine gut-associated lymphoid tissues. I. T cells derived from Peyer's patches that switch sIgM B cells to sIgA B cells *in vitro*. *J. Exp. Med.*, **157**: 433.

Kiyono, H., Cooper, M.D., Kearney, J.F., Mosteller, L.M., Michalek, S.M., Koopman, W.J. and McGhee, J.R. (1984). Isotype-specificity of helper T-cell clones. Peyer's patch Th cells preferentially collaborate with mature IgA B cells for IgA responses. *J. Exp. Med.*, **159**: 798.

Kiyono, H., McGhee, J.R., Mosteller, L.M., Eldridge, J.H., Koopman, W.J., Kearney, J.F. and Michalek, S.M. (1982). Murine Peyer's patch T-cell clones: characterization of antigen-specific helper T cells for immunoglobulin A responses. *J. Exp. Med.*, **156**: 1115.

Kiyono, H., Mosteller, L.M., Eldridge, J.H., Michalek, S.M. and McGhee, J.R. (1983). IgA responses in *xid* mice: oral antigen primes Peyer's patch cells for *in vitro* immune-responses and secretory antibody production. *J. Immunol.*, **131**: 2616.

Kliebenstein, J., Kirtley, C. and Selby, L. (1982/1983). A survey of swine production health problems and health maintenance expenditures. *Prev. Vet. Med.*, **1**: 357-369.

Kodama, Y., Ogata, M. and Simizu, Y. (1980). Characterization of immunoglobulin A antibody in serum of swine inoculated with transmissible gastroenteritis virus. *Am. J. Vet. Res.*, **41**: 740-745.

Lai, M.M.C. (1986). Coronavirus leader-RNA-primed transcription: an alternative mechanism to RNA splicing. *Bio Essays*, **5**: 527-260.

Lai, M.M.C. (1990). Coronavirus: organization, replication and expression of genome. *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**: 303-333.

Lange, E., Schirrmeier, H., Granzow, H., Fichtner, D. und Leopoldt, D. (1988). Isolierung und erste charakterisierung eines Coronavirus aus Lungen und Tonsillen Klinisch gesunder Schweine. *Mh. Vet. Med.*, **43**: 273-274.

Lanza, I. (1991). Epidemiología de las infecciones por el virus de la gastroenteritis transmisible y por el coronavirus respiratorio porcino. Diagnóstico diferencial. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Universidad de León, (España).

Lanza, I., Rubio, P. y Cármenes, P. (1990). Prevalencia de anticuerpos frente al virus de la gastroenteritis transmisible/coronavirus respiratorio porcino. *ANAPORC*, **87**: 3-4.

Laude, H., Chapsal, J.M., Gelfi, J., Labiau, S. and Grosclaude, J. (1986). Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus. I. Properties of monoclonal antibodies directed against virion proteins. *J. Gen. Virol.*, **67**: 119-130.

Laude, H., Gelfi, J., Lavenant, L. and Charley, B. (1992). Single aminoacid changes in the viral glycoprotein M affect induction of alpha interferon by the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.*, **66**: 743-749.

Laude, H., Gelfi, J., Rasschaert, D. et Delmas, B. (1988). Caractérisation antigénique du coronavirus respiratoire porcin a l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre le virus de la gastro-entérite transmisible. *Journées Rech. Porcine en France*, **20**: 89-94.

Laude, H., Rasschaert, D., Delmas, B., Godet, M., Gelfi, J. and Charley, B. (1990). Molecular biology of transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.*, **23**: 147-154.

Laude, H., Rasschaert, D. and Huet, J.C. (1987). Sequence and N-terminal processing of the transmembrane protein E1 of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.*, **68**: 1687-1693.

Laude, H., Van Reeth, K. and Pensaert, M. (1993). Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. *Vet. Res.*, **24**: 125-150.

Laval, A., Le Foll, P., Gestin, G. et Reynaud, G. (1991). Gripes et coronavirus respiratoire porcin: étude sérologique dans dix élevages bretons. *Rec. Méd. Vét.*, **167**: 521-528.

Laviada, M.D. (1991). Virus de la gastroenteritis porcina transmisible: diagnóstico diferencial y proteínas de infección. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid, (España).

Laviada, M.D., de Diego, M. and Escribano, J.M. (1991). Proteins specified by swine transmissible gastroenteritis virus: identification of non-structural proteins by two-dimensional electrophoresis. *Microbiología SEM*, 7: 90-97.

Laviada, M.D., de Diego, M. and Escribano, J.M. (1992). Etiología: estructura antigénica y genética del VGPT. *PORCI*, 10: 11-18

Laviada, M.D., Marcotegui, M.A. y Escribano, J.M. (1988). Diagnóstico e identificación de un brote de gastroenteritis transmisible porcina en España. *Med. Vet.*, 5: 563-575.

Laviada, M.D., Videgain, S.P., Moreno, L., Alonso, F., Enjuanes, L. and Escribano, J.M. (1990). Expression of swine transmissible gastroenteritis virus envelope antigens on the surface of infected cells: epitopes externally exposed. *Virus Research*, 16: 247-254.

Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.

Luytjes, W., Bredenbeek, P.J., Noten, A.F., Horzinek, M.C. and Spaan, W.J.M. (1988). Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA-recombination between coronaviruses and influenza C virus. *Virology*, 166: 415-423.

Luytjes, W., Sturman, L.S., Bredenbeek, P.J., Charite, J., Van der Zeijst, B.A.M., Horzinek, M.C. and Spaan, W.J.M. (1987). Primary structure of the glycoprotein E2 of coronavirus MHV-A59 and identification of the trypsin cleavage site. *Virology*, 161: 479-487.

Marrack, P. and Kappler, J. (1986). The antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted receptor on T cells. *Adv. Immunol.*, 38: 1.

Mathiesen, T., P. A. Broliden, J. Rosen, and B. Wahren. (1989). Mapping of IgG subclass and T-cell epitopes on HIV proteins by synthetic peptides. *Immunology* **67**: 453-459.

McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M. and Kiyono, H. (1992). The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*, **10**: 75-88.

McGhee, J.R., Mestecky, J., Elson, C.O. and Kiyono, H. (1989). Regulation of IgA synthesis and immune responses by T cells and interleukins. *J. Clin. Immunol.*, **9**: 175.

Moon, H.W. (1978). Mechanisms in the pathogenesis of diarrhea: a review. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **172**: 443-448.

Möstl, K., Callebaut, P., Horvath, E., Pensaert, M.B. und Bürki, F. (1989). Erhebungen über porcine coronaviren in Österreich. I. Teil: TGEV und das TGEV-verwandte respiratorischen Coronavirus der Schweine. *Wien. Tierärztl. Mschr.*, **76**: 395-400.

Moxley, R.A. and Olson, L.R.D. (1989). Clinical evaluation of transmissible gastroenteritis virus vaccines and vaccination procedures for inducing lactogenic immunity in sows. *Am. J. Vet. Res.*, **50**: 111-118.

Moxley, R.A., Olson, L.R.D. and Solorzano, R.F. (1989). Relationship among transmissible gastroenteritis virus antibody titers in serum, colostrum and milk from vaccinated sows, and protection in their suckling pigs. *Am. J. Vet. Res.*, **50**: 119-125.

Nagura, H., Nakane, D.K. and Brown, W.R. (1978). Breast milk IgA binds to jejunal epithelial cells in suckling rats. *J. Immunol.*, **120**: 1330-1339.

Newby, T.J., Stokes, C.R. and Bourne, F.J. (1982). Immunological activities of milk. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **3**: 67-94.

Nguyen, T.D., Bottreau, E., Bernard, S., Lantier, I. and Aynaud, J.M. (1986). Neutralizing secretory IgA and IgG do not inhibit attachment of transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.*, **67**: 939-943.

Nowinski, R.C., Lostrom, M.E., Tam, M.R., Stone, M.R. and Burnette, W.N. (1979). The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15 (E) protein of murine leukemia viruses. *Virology*, **93**: 111-126.

Opdebeeck, J.P. (1982). Mammary gland immunity. *JAVMA*, **181**: 1061-1065.

O'Toole, D., Brown, I., Bridges, A. and Cartwright, S.F. (1989). Pathogenicity of experimental infection with "pneumotropic" porcine coronavirus. *Res. Vet. Sci.*, **47**: 23-29.

Page, K.W., Mawditt, M.L. and Britton, P. (1991). Sequence comparison of the 5' end of mRNA 3 from transmissible gastroenteritis virus and porcine respiratory coronavirus. *J. Gen. Virol.*, **72**: 579-587.

Pastor, M.J., Arias, M. and Escribano, J.M. (1990). Comparison of two antigens for use in an enzyme linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibodies. *Am. J. Vet. Res.*, **51**: 1540-1543.

Paton, D. and Brown, I. (1990). Sows infected in pregnancy with porcine respiratory coronavirus show no evidence of protecting their sucking piglets against transmissible gastroenteritis. *Vet. Res. Comm.*, **14**: 329-337.

Paul, P.S., Zhu, X., Richardson, M. and Rosen, B. (1986). Subunits of transmissible gastroenteritis virus (TGEV) of swine following enzymatic digestion. 67th Annual Meeting of the conference of research workers in animal disease. Chicago, Illinois (EE.UU.).

Pensaert, M.B. (1979). Immunity in TGE of swine after infection and vaccination. En: "Viral enteritis in humans and animals". Bricont, F. and Scherrer, R. (eds.). INSERM (Paris), **90**: 281-293.

Pensaert, M.B. (1989). Transmissible gastroenteritis virus (respiratory variant). En: "Virus infections of porcines". Pensaert, M. (ed.), Elsevier Science Publishers, B. V., Amsterdam, (Holanda).

Pensaert, M.B., Callebaut, P. and Hooybergs, J. (1987). Transmissible gastroenteritis virus in swine: old and new.. VII Symposium ANAPORC, Expoaviga 87, Barcelona, (España), pp. 40-45.

Pensaert, M.B., Callebaut, P. and Vergote, J. (1986). Isolation of a porcine respiratory, non-enteric coronavirus related to transmissible gastroenteritis. Vet. Quart., 8: 257-261.

Pensaert, M.B. and Cox, E. (1989). A porcine respiratory coronavirus related to transmissible gastroenteritis virus is widespread in Europe. Agri-Practice, 10: 17-21.

Pensaert, M.B., Cox, E., Van Deun, K. and Callebaut, P. (1992). A seroepizootiological study of the porcine respiratory coronavirus in the Belgian swine population. Vet. Quart. (en prensa)

Pharmacia. (1988). "Affinity chromatography. Principles & Methods". Ljungföretajen AB. Suecia.

Plana, J., Vayreda, M. y Marull, L. (1982). Gastroenteritis vírica porcina: diagnóstico serológico de una virosis mortal en el cerdo. VII International Symposium of W.A.V.M.I. Barcelona, (España), p. 162.

Porter, P. (1986). Immune System. En: "Diseases of swine". Leman, A.D, y col. (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, (EE.UU.), pp.: 44-57.

Porter, P., and W. D. Allen. (1972). Classes of immunoglobulins related to immunity in the pig. J. Am. Vet. Med. Assoc., 160: 511-518.

Pospischil, A., Cox, E. and Pensaert, M.B. (1990). Localization of porcine respiratory coronavirus in the small intestine of experimentally infected piglets. Proc. 11th IPVS Congress, Lausanne, (Suiza), p. 219.

Pulford, D.J. and Britton, P. (1991). Intracellular processing of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Virology*, **182**: 765-773.

Rasschaert, D., Delmas, B., Charley, B., Grosclaude, J., Gelfi, J. and Laude, H. (1987a). Surface glycoproteins of transmissible gastroenteritis virus: functions and gene sequence. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **218**: 109-116.

Rasschaert, D., Duarte, M. and Laude, H. (1990). Porcine respiratory coronavirus differs from transmissible gastroenteritis virus by a few genomic deletions. *J. Gen. Virol.*, **71**: 2599-2607.

Rasschaert, D., Gelfi, J. and Laude, H. (1987b). Enteric coronavirus TGEV: partial sequence of the genomic RNA, its organization and expression. *Biochemie*, **69**: 591-600.

Rasschaert, D. and Laude, H. (1987). The predicted primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J. Gen. Virol.*, **68**: 1883-1890.

Reed, L.J. and Muench, R.H. (1938). A simple method to estimate fifty per cent end points. *Am. J. Hyg.*, **27**: 493-497.

Renegar, K.B. and Small, P.A. Jr. (1991). Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. *J. Virol.*, **65**: 2146-2148.

Reynolds, D.J., Garwes, D.J. and Gaskell, C.J. (1977). Detection of transmissible gastroenteritis virus neutralising antibody in cats. *Arch. Virol.*, **55**: 77-86.

Rubio, P., Alvarez, M. y Cármenes, P. (1987). Estudio epizootiológico de la GET en Castilla y León. VIII Simposium ANAPORC, Expoaviga 87, Barcelona, (España), pp. 46-47.

Saif, L. J., and E. H. Bohl. (1979a). Role of secretory IgA in passive immunity of swine to enteric viral infection. En: "Immunology of breast milk". P. Ogra and D. Dayton (ed.), Raven Press, New York (EE.UU.), pp. 237-248.

Saif, L. J., and E. H. Bohl. (1979b). Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: immunoglobulin classes of milk antibodies after oral-intranasal inoculation of sows with a live low cell culture-passaged virus. *Am. J. Vet. Res.*, **40**: 115-117.

Saif, L.J. and Bohl, E.H. (1983). Passive immunity to transmissible gastroenteritis virus: intramammary viral inoculation of sows. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **409**: 708-722.

Saif, L.J. and Bohl, E.H. (1986). Transmissible gastroenteritis. En: "Diseases of swine". Leman, A.D, y col. (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, (EE.UU.), pp. 255-274.

Salmon, H. (1989). Humoral lactogenic immunity in the sow: basis and practice. *Pig News and Information*, **10**: 151-157.

Sánchez, C., J. Coll, and J. Domínguez. (1991). One-step purification of the major rainbow trout immunoglobulin. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **27**: 383-391.

Sánchez, C.M., Gebauer, F., Suñé, C., Mendez, A., Dopazo, J. and Enjuanes, L. (1992). Genetic evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronaviruses. *Virology*, **190**: 92-105.

Sánchez, C.M., Jiménez, G., Laviada, M.D., Correa, I., Suñé, C., Bullido, M.J., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J.M. and Enjuanes, L. (1990). Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology*, **174**: 410-417.

Sasahara, J., Harada, K., Hayashi, S. and Watanabe, M. (1958). Studies on transmissible gastroenteritis in pigs in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **20**: 1-6.

Schmidt, L., Skinner, M. and Sidell, S.G. (1987). Nucleotide sequence of the gene encoding the surface projection glycoprotein of coronavirus MHV-JHM. *J. Gen. Virol.*, **68**: 47-56.

Schoenbeck, S., McKenzie, D.T. and Kagnoff, M.F. (1989). Interleukin 5 is an differentiation factor for IgA B cells. *Eur. J. Immunol.*, **19**: 965-969.

Shepherd, R.W., Gall, D.G., Butler, D.G. and Hamilton, J.R. (1979). Determinants of diarrhea in viral enteritis: the role of ion transport and epithelial changes in the ileum in transmissible gastroenteritis in piglets. *Gastroenterology*, **176**: 20-24.

Shirai, J., Lantier, I., Bottreau, E., Aynaud, J.M. and Bernard, S. (1988). Lactogenic immunity to transmissible gastroenteritis (TGE) of swine induced by the attenuated Nouzilly strain of TGE virus: neutralizing antibody classes and protection. *Ann. Rech. Vet.*, **19**: 267-272.

Siddell, S.G., Wege, H. and Meulen, V.T. (1983). The biology of coronaviruses. *J. Gen. Virol.*, **64**: 761-776.

Skinner, M.A., Ebner, D. and Sidell, S.G. (1985). Coronavirus MHV-JHM mRNA 5 has a sequence arrangement which potentially allows traslation of a second, downstream open reading frame. *J. Gen. Virol.*, **66**: 581-592.

Skinner, M.A. and Sidell, S.G. (1983). Coronavirus JHM: nucleotide sequence of the mRNA that encodes nucleocapsid protein. *Nucleic Acid Research*, **11**: 5045-5054.

Skinner, M.A. and Sidell, S.G. (1985). Coding sequence of coronavirus MHV-JHM mRNA 4. *J. Gen. Virol.*, **66**: 593-596.

Sonoda, E., Matsumoto, R., Hitoshi, Y., Sugimoto, M., Araki, S. *et al.* (1989). Transforming growth factor β induces IgA production and act additively with interleukin 5 for IgA production. *J. Exp. Med.*, **170**: 1415.

Spaan, W.J.M., Cavanagh, D. and Horzinek, M.C. (1988). Coronaviruses: structure and genome expression. *J. Gen. Virol.*, **69**: 2939-2952.

Sprino, P.J. and Ristic, M. (1982). Intestinal, pulmonary and serum antibody responses of feeder pigs exposed to transmissible gastroenteritis virus by oral and oral-intranasal routes of inoculation. *Am. J. Vet. Res.*, **43**: 255-261.

Stone, S.S., Kemeny, L.J., Woods, R.D. and Jensen, M.T. (1977). Efficacy of isolated colostral IgA, IgG and IgM(A) to protect neonatal pigs against the coronavirus of transmissible gastroenteritis. *Am. J. Vet. Res.*, **38**: 1285-1288.

Stone, S.S., Phillips, M. and Kemeny, L.J. (1979). Stability of porcine colostral immunoglobulins IgA, IgG₂ and IgM to proteolytic enzymes. *Am. J. Vet. Res.*, **40**: 607-612.

Suñé, C., Jiménez, G., Correa, I., Bullido, M.J., Gebauer, F., Smerdou, C. and Enjuanes, L. (1990). Mechanisms of transmissible gastroenteritis coronavirus neutralization. *Virology*, **177**: 559-569.

Tabarés, E., Marcotegui, M.A., Fernández, M. and Sánchez-Botija, C. (1980). Proteins specified by African swine fever virus. I. Analysis of viral structural proteins and antigenic properties. *Arch. Virol.*, **66**: 107-117.

Targan, S.R. and Shanahan, F. (eds.) (1990). "Immunology and immunopathology of the liver and gastrointestinal tract". Igaku-Shoin Medical Publishers, Inc., New York, Tokyo.

Thorsen, J. and Djurickovic, S. (1971). Experimental immunization of sows with inactivated transmissible gastroenteritis (TGE) virus. *Can. J. Comp. Med.*, **35**: 99-102.

Toma, B., Vannier, P. et Aynaud, J.M. (1978). Enquête épidémiologique sur la gastro-entérite transmissible du porc en France. *Rec. Méd. Vét.*, **154**: 853-858.

Tooze, J., Tooze, S. and Warren, G. (1984). Replication of coronavirus MHV-A59 in sac-cells: determination of the first site of budding of progeny virions. *Eur. J. Cell Biol.*, **33**: 281-293.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 4350-4354.

Tuboly, S., Bernáth, S., Glávits, R. and Medveczky, I. (1988). Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **20**: 75-85.

Ulbrich, F., Hendel, C., Zureck, J., Schneider, G., Ehrlich, K., Richter, M., Aschmann, L. und Müller, C. (1991). Auftreten klinischer erscheinungen bei laktierenden sauen im zusammenhang mit der infektion durch porcines respiratorisches coronavirus. *Monatsh Veterinaer Med.*, **46**: 128-133.

Underdown, B.J. and Dorrington, K.J. (1974). Studies on the structural and conformational basis for the relative resistance of serum and secretory immunoglobulin A to proteolysis. *J. Immunol.*, **112**: 949-959.

Valencak, Z., Böhm, O., Grom, J. and Zeleznik, Z. (1990). The serological status to transmissible gastroenteritis (TGEV) in Slovenia. *Proc. 11th IPVS Congress, Lausanne, (Suiza), p. 261.*

Van Deun, K., Cox, E., Callebaut, P. and Pensaert, M.B. (1990). Milk of sows infected with the porcine respiratory coronavirus: induction of IgA antibodies against transmissible gastroenteritis coronavirus and protective capacity against intestinal infection in piglets. *Proc. 11th IPVS Congress, Lausanne, (Suiza), pp. 263.*

Vannier, P., Jestin, A., Le Forban, Y. et Madec, F. (1987). Apparition d'un nouveau coronavirus (pseudo GET) porcin en France. *Epidémiol. Santé Anim.*, **12**: 37-43.

Vannier, P., Tillon, J., Aynaud, J.M. et Mallory, L. (1977). Gastro-entérite transmissible du porc: application de la séroneutralisation al diagnostic et a l'epidémiologie de la maladie. *Rec. Méd. Vét.*, **153**: 103-108.

Van Nieuwstadt, A. and Boonstra, J. (1990). A competition ELISA to distinguish TGEV-from PRCV-infected pigs. *Proc. 11th IPVS Congress, Lausanne, (Suiza), pp.: 265.*

Van Nieuwstadt, A. and Pol, J. (1989). Isolation of a TGE-related respiratory coronavirus causing fatal pneumonia in pigs. *Vet. Rec.*, **124**: 43-44.

Van Nieuwstadt, A., Zetstra, T. and Boonstra, J. (1989). Infections with porcine respiratory coronavirus does not fully protect pigs against transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Rec.*, **125**: 58-60.

Voets, M.T., Pensaert M.B. and Rondhuis, P.R. (1980). Vaccination of pregnant sows against transmissible gastroenteritis with two attenuated virus strains and different inoculation routes. *Vet. Q.*, **2**: 211-219.

Welch, S-K.W. and Saif, L.J. (1988). Monoclonal antibodies to a virulent strain of transmissible gastroenteritis virus: comparison of reactivity with virulent and attenuated virus. *Arch. Virol.*, **101**: 221-235.

Welch, S-K.W., Saif, L.J. and Ram, S. (1988). Cell-mediated immune responses of suckling pigs inoculated with attenuated or virulent transmissible gastroenteritis virus. *Am. J. Vet. Res.*, **49**: 1228-1234.

Welliver, R.C. and Ogra, P.L. (1978). Importance of local immunity in enteric infection. *JAVMA*, **173**: 560-564.

Wesley, R.D., Cheung, A.K., Michael, D.D. and Woods, R.D. (1989). Nucleotide sequence of coronavirus TGEV genomic RNA: evidence for 3 mRNA species between the peplomer and matrix protein genes. *Virus Research*, **13**: 87-100.

Wesley, R.D., Woods, R.D., Correa, I. and Enjuanes, L. (1988). Lack of protection in vivo with neutralizing monoclonal antibodies to transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol.*, **18**: 197-208.

Wesley, R.D., Woods, R.D. and Cheung, A.K. (1991). Genetic analysis of porcine respiratory coronavirus, an attenuated variant of transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.*, **65**: 3369-3373.

Wesley, R.D., Woods, R.D., Hill, H.T. and Biwer, J. (1990). Evidence for a porcine respiratory coronavirus antigenically similar to transmissible gastroenteritis virus, in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**: 312-317.

Witte, K.H. (1974). Häufigkeit und Verbreitung Transmissible Gastroenteritis (TGE) virus-neutralisierender AntiKörper bei Mastschweinen in acht Kreisen Norwestdeutschlands. Zentralbl. Veterinaermed. Beih., **21**: 376-384.

Wolf, J.L. and Bye, W.A. (1984). The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. Annu. Rev. Med., **35**: 95.

Woods, R.D. (1978). Small plaque variant transmissible gastroenteritis virus. J. Am. Vet. Med. Assoc., **173**: 643-647.

Woods, R.D. and Pedersen, N.C. (1979). Cross-protection studies between feline infectious peritonitis and porcine transmissible gastroenteritis viruses. Vet. Microbiol., **4**: 11-16.

Woods, R.D. and Wesley, R.D. (1986). Immune response in sows given transmissible gastroenteritis virus or canine coronavirus. Am. J. Vet. Res., **47**: 1239-1242.

Woods, R.D., Wesley, R.D. and Kapke, P.A. (1986). Complement-dependent neutralization of transmissible gastroenteritis virus by monoclonal antibodies. Adv. Exp. Med. Biol., **218**: 493-500.

Woods, R.D., Wesley, R.D. and Kapke, P.A. (1988). Neutralization of porcine transmissible gastroenteritis virus by complement-dependent monoclonal antibodies. Am. J. Vet. Res., **49**: 300-304.

Yus, E., Laviada, M.D., Moreno, L., Castro, J.M., Escribano, J.M. y Simarro, I. (1989). Prevalencia de anticuerpos frente a virus influenza y coronavirus respiratorio porcino en cerdos de cebo en España. J. Vet. Med. B, **36**: 551-556.


Apt. 1000, 1000

11. *guineensis*
12. *guineensis*
13.

1. *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud.

Rich. Engle

✓ 25.000



100



1. *Chlorophyll a* and *Chlorophyll b* contents were determined by the method of Arar and *et al.* (1996).

W. H. C. Carter